



**Universidade de
Aveiro
2007**

Departamento de Biologia

**Brígida Trigo de
Miranda Strecht
Monteiro**

**Interacção *in vitro* entre *Quercus suber* L. e
Phytophthora cinnamomi Rands**



Universidade de
Aveiro
2007

Departamento de Biologia

**Brígida Trigo de
Miranda Strecht
Monteiro**

**Interacção *in vitro* entre *Quercus suber* L. e
Phytophthora cinnamomi Rands**

tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Biologia, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Gustavo Cardoso Nunes Caldeira, Professor Catedrático Jubilado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Apoio financeiro da FCT no âmbito do
Programa Praxis XXI

Dedico este trabalho ao Afonso e ao Ricardo
*pelos longos períodos de
ausência*

o júri

presidente

Doutora **Maria Hermínia Deulonder Correia Amado Laurel**
professora catedrática da Universidade de Aveiro

Doutor **Gustavo Cardoso Nunes Caldeira**
professor catedrático jubilado da Universidade de Aveiro (**orientador**)

Doutora **Maria Ivone Esteves da Clara**
professora catedrática da Universidade de Évora

Doutor **Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares**
professor catedrático da Universidade de Aveiro

Doutora **Maria Ana Dias Monteiro Santos**
professora catedrática da Universidade de Aveiro

Doutora **Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos**
professora associada da Universidade de Aveiro

Doutor **Luís Miguel Pontes Martins**
professor auxiliar da Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro

agradecimentos

Ao Professor Catedrático Jubilado Doutor Gustavo Cardoso Caldeira desejo expressar o meu sincero e reconhecido agradecimento pela preciosa orientação científica deste trabalho, pelas condições materiais disponibilizadas e pelo apoio e incentivo durante o progresso do mesmo. Agradeço-lhe ainda os comentários, as sugestões e as críticas durante a parte experimental. Cabe-me também agradecer-lhe o valioso auxílio prestado durante a redacção deste manuscrito, com numerosas e oportunas correcções e a cuidada revisão final desta tese.

À Professora Doutora Hortense Deolinda Caldeira uma palavra particular de agradecimento pelos ensinamentos, disponibilidade, apoio e interesse manifestados por este trabalho.

À Professora Doutora Etelvina Figueira agradeço a ajuda prestada na realização prática do trabalho experimental, a amizade demonstrada, o entusiasmo, a boa disposição, o alegre convívio e a disponibilidade com que me presenteou ao longo destes anos.

À Professora Doutora Conceição Santos o meu grande agradecimento pela sua contribuição e auxílio prestado nos procedimentos relativos à Microscopia Electrónica de Transmissão.

Uma referência à Dra. Clarinda Ferreira pela ajuda prestada na realização prática no início do trabalho experimental.

Aos Colegas e Funcionários dos vários sectores do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e, em particular, aos Colegas do Sector de Fisiologia Vegetal, agradeço o alegre convívio e colaboração.

À D. Maria José e ao Eng. Armando Costa agradeço toda a colaboração, boa disposição e o alegre convívio.

Ao Programa PRAXIS XXI desejo agradecer o apoio financeiro concedido, que possibilitou a realização deste estudo, bem como os subsídios concedidos para a participação em congressos internacionais.

À Dr^a. A. R. Hardham, do Plant Cell Biology Group, Research School of Biological Science, Australian National University, pela oferta da estirpe H1000 e pelas sugestões para o trabalho.

À Eng.^a Manuela Baião do CENASEF (Centro Nacional de Sementes Florestais), pela oferta das landes.

Ao Dr. Arthur de Cock, CBS – Yeast Division, Delft, Holanda, pela ajuda na resolução de alguns problemas.

À firma RAMAZZOTTI, pela oferta do sumo V8.

Ao Sr. Joaquim Amorim e Sr. Luís Malheiro, pela facilidade de obtenção de material vegetal, na Herdade da Defesa-de-Cima e outros locais em Montemor-o-Novo.

Ao Sr. Manuel Sá Bastos e Eng.^o Paulo Ribeiro, pela possibilidade de colheita de material vegetal em vários locais de Ponte-de-Sôr.

Ao Arquitecto Sérgio Mendes pela permissão de colheita na Quinta da Casa Grande de Pinhovelo, Macedo de Cavaleiros.

Ao Nuno pelo carinho, apoio e presença em todos os momentos difíceis. Aos meus pais e meus sogros, pelo seu apoio incondicional, a sua compreensão e, principalmente, por todo o carinho com que sempre me rodearam.

E por último, os meus agradecimentos a todos quantos, ainda que aqui não mencionados, de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

palavras-chave

Quercus suber, *Phytophthora cinnamomi*, cultura de tecidos vegetais, micropropagação, tecido caloso, patogénese, electroforese capilar, PAGE-SDS

resumo

Este trabalho circunscreve-se na área da fitopatologia e tem por objectivo principal a contribuição para o levantamento de alguns mecanismos relacionados com a resistência e a susceptibilidade de *Quercus suber* ao agente etiológico *Phytophthora cinnamomi*.

Para a iniciação de culturas *in vitro* de *Q. suber* propõe-se uma abordagem de desinfecção superficial por aplicação de Peróxido de Hidrogénio. Tanto do ponto de vista quantitativo, como qualitativo, este método produziu resultados melhores em termos de indução e manutenção de porções aéreas e de tecido caloso de *Q. suber in vitro* ($p < 0,001$) e taxas de descontaminação sempre superiores a 88,8%. Os tecidos vegetais cresceram melhor em meio nutritivo de Gresshoff e Doy modificado.

Por aplicação de uma combinação de dois métodos para produção de zoósporos e duas estirpes patogénicas, obtiveram-se suspensões de zoósporos de *P. cinnamomi*. O método de CHAMBERS *et al.* (1995) e a estirpe H1000 contribuíram com os melhores resultados (10^4 zoósporos.mL⁻¹).

A infecção das culturas (plântulas micropropagadas, porções aéreas e tecido caloso) forneceu quadros sintomatológicos de infecção em tudo semelhantes ao que sucede na interacção *in vivo*. Foram eleitos entre os clones de tecido caloso disponíveis um resistente (proveniente de Montemor-o-Novo) e um susceptível (proveniente de Ponte-de-Sôr). Foram analisados alguns parâmetros químicos e bioquímicos (Cl⁻, SO₄²⁻, NO₃⁻, NO₂⁻, HPO₄³⁻, F⁻, ião oxalato, Na⁺, K⁺, NH₄⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ por electroforese capilar e perfis peptídicos em electroforese de geles de poli-acrilamida em condições desnaturantes) após a interacção do tecido caloso (a crescer em meios com diferentes composições hormonais) com os zoósporos de *P. cinnamomi*.

Na presença do agente patogénico as quantidades dos iões NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻ e F⁻ eram vestigiais, dos iões K⁺, Ca²⁺ e Na⁺ diminuíam, do ião Mg²⁺ mantinham-se, mais ou menos estáveis, dos iões Cl⁻ e SO₄²⁻ diminuíam no tecido resistente e mantinham-se constantes no tecido susceptível, e do anião HPO₄²⁻ mantinham-se constantes no tecido resistente e diminuíam no tecido susceptível. Para o tecido susceptível os ganhos em número de bandas são maiores entre os 205-100 kDa e para o tecido resistente entre os 13-5 kDa.

Nos pesos moleculares entre 100-60 kDa, 60-40 kDa e 40-13 kDa, o número de bandas é sempre superior no tecido resistente e este é o que apresenta maiores perdas ao longo da interacção. Correlacionando o número de bandas dos perfis peptídicos com as concentrações em iões foram obtidas três correlações positivas (Mg²⁺/40-13 kDa; Cl⁻/100-60 kDa e Cl⁻/60-40 kDa) e duas negativas (K⁺/13-5 kDa e Oxalato/205-100 kDa).

Neste modelo de interacção foi encontrada maior relevância nas variações do número de bandas nos perfis peptídicos (60-40 kDa>40-13 kDa>100-60 kDa>205-100 kDa>13-5 kDa), seguida da relevância dos catiões (K⁺>Na⁺>Mg²⁺>Ca²⁺) e dos aniões (SO₄²⁻>Cl⁻>HPO₄²⁻). Igualmente relevante o número de bandas entre 13 a 5 kDa e a concentração em ião oxalato (com contributos com 52,08% e 60,99%, respectivamente).

keywords

Quercus suber, *Phytophthora cinnamomi*, plant tissue culture, micropropagation, calli tissue, pathogenesis, capillary electrophoresis, PAGE-SDS.

abstract

This is a work in the area of the phytopathology and the main goal is to contribute to the finding of some mechanisms related to the resistance and the susceptibility of *Quercus suber* to the pathogen *Phytophthora cinnamomi*. To initiate *Q. suber in vitro* cultures the application of hydrogen peroxide as a superficial disinfection agent is proposed. This method was better from the qualitative and quantitative point of view to the induction and maintenance of *Q. suber in vitro* cultures ($p < 0,001$) and the decontamination level was over 88%. The tissues grew better in modified Gresshoff and Doy medium. *P. cinnamomi* zoospores suspensions were obtained by combining two zoospores production methods and two pathogenic isolates. The best results were achieved with CHAMBERS *et al.* (1995) method and H1000 isolate (10^4 zoospores.mL⁻¹). The infection of the cultures (micropropagated plantlets, shoots and calli) showed several symptomatologic degrees of infection comparable to the *in vivo* interaction. One calli clone resistant (from Montemor-o-Novo) and other susceptible (from Ponte-de-Sôr) were elected from the available clones. Some chemical and biochemical parameters (Cl⁻, SO₄²⁻, NO₃⁻, NO₂⁻, HPO₄³⁻, F⁻, oxalate ion, Na⁺, K⁺, NH₄⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ by capillary electrophoresis and the polypeptide profile determination by denaturant polyacrilamide gels electrophoresis) were analysed after calli cultures (growing in different hormonal compositions) and *P. cinnamomi* zoospores interaction. In the presence of the pathogen the quantities of NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻ and F⁻ ions were almost nulls, K⁺, Ca²⁺ and Na⁺ ions diminished, Mg²⁺ ion maintained more or less stable, Cl⁻ and SO₄²⁻ ions diminished in the resistant tissue and maintained constant in the susceptible tissue, and HPO₄²⁻ ion maintained constant in the resistant tissue and diminished in the susceptible tissue. Gains in the number of bands in the challenged susceptible tissue were greater between 205-100 kDa and in the susceptible tissue between 13-5 kDa. The number of bands in the molecular weights between 100-60 kDa, 60-40 kDa and 40-13 kDa was always superior in the resistant tissue and this always showed greater losses along the interaction. By correlating the number of band obtained in SDS PAGE with the ion concentrations we obtained three positive correlations (Mg²⁺/40-13 kDa; Cl⁻/100-60 kDa and Cl⁻/60-40 kDa) and two negative correlations (K⁺/13-5 kDa and Oxalate/205-100 kDa). In this interaction model greater relevancy was found in the polypeptide profile bands numbers variations (60-40 kDa > 40-13 kDa > 100-60 kDa > 205-100 kDa > 13-5 kDa), followed by the relevancy of the cations (K⁺ > Na⁺ > Mg²⁺ > Ca²⁺) and of the anions (SO₄²⁻ > Cl⁻ > HPO₄²⁻). The band number between 13-5 kDa and the oxalate concentration were equally important (with 52,08% and 60,99% contributions, respectively).

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A – Absorvância	N – Número de indivíduos
aff. - Abreviatura usada pelos autores da literatura original para apontar que identificação da subespécie foi impossível.	NAA – Ácido α -naftaleno l-acético
ANOVA – Análise da variância entre grupos (do anglo-saxónico <i>analysis of variance</i>)	NS – Não significativo
atm – Atmosfera	OEMPP – Organização Europeia e Mediterrânica de Protecção das Plantas
BAP – 6-Benzilaminopurina	p – Probabilidade estatística
BSA – Do anglo-saxónico: bovine serum albumin – albumina sérica de bovino	p. ex. – por exemplo
CaM – Calmodulina	p/v – Peso/volume
CCF – Cotação do Crescimento Fúngico	PAGE – Do anglo-saxónico Polyacrylamide gel electrophoresis – Electroforese em gel de poliacrilamida
CDPK – Do anglo-saxónico calcium dependent protein kinase – proteína quinase dependente de cálcio.	Pc – <i>Phytophthora cinnamomi</i>
chs – Sintase da chalcona	PCR – Do anglo-saxónico Polymerase Chain Reaction – reacção em cadeia da polimerase
CMI - Do anglo-saxónico Commonwealth Mycological Institute – Instituto Micológico da Commonwealth	PF – Peso fresco
Conc. – Concentração	pinI – inibidor da proteinase
CZ – Solução de sais de Chen e Zentmyer	PIPES - ácido de Piperazina-1,4-bis(2-etanosulfónico)
DTT – Ditiotreitól	PM - Peso molecular
DP – Desvio Padrão	Pmm – <i>Phytophthora megasperma</i> var. <i>medicaginis</i>
EC – Electroforese capilar	PMSF – Do anglo-saxónico: phenylmethylsulphonyl fluoride – Fluoreto de fenilmetilsulfonil
EDTA – Do anglo-saxónico ethylene diamine tetracetic acid – Tetra-acetato de etilenodiamina	Ppn – <i>Phytophthora parasitica</i> var. <i>nicotianae</i>
EFE – enzima envolvida na formação de etileno	ppm – partes por milhão
ELISA – Do anglo-saxónico Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay – Abreviatura utilizada para ensaios imunoenzimáticos colorimétricos.	PR-proteínas – Proteínas relacionadas com a patogénese
EMPPPO – do anglo-saxónico European and Mediterranean Plant Protection Organization – Organização Europeia e Mediterrânica de Protecção das Plantas	PTFE – Politetrafluoroetileno – plástico com uma vasta gama de utilizações dadas as suas características: (quimicamente inerte a temperaturas e pressões elevadas; totalmente não tóxico; anti-aderente; excepcionais propriedades eléctricas e dieléctricas; resistência à tracção moderada; flexível mas não elástico)
ES – Extracto de solo	PVP – Polivinilpirrolidona
ETH – Etileno	opm. – Orbitais por minuto
EtOH – Etanol	rpm – Rotações por minuto
ex. – exemplo	RAL – Resistência adquirida local
g – Força gravitacional	RAS – Resistência adquirida sistémica
GD – Meio de cultura de Gresshoff e Doy	rbCL – Subunidade maior da carboxilase da ribulose bifosfato
GDM – Meio de cultura de Gresshoff e Doy modificado	RFLP – Do anglo-saxónico restriction fragment length polymorphism - polimorfismo dos macrofragmentos de restrição
GDMFL – Meio de cultura de Gresshoff e Doy modificado com vitaminas de Fossard e Lee (sem reguladores de crescimento)	RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro
GDMFL-IR – Meio optimizado para indução de raízes	ROI – Intermediário de oxigénio reactivo
GDMFL-PA – Meio optimizado para indução e manutenção de porções aéreas	RSI – Resistência sistémica induzida
GDMFL-TC – Meio optimizado para indução e manutenção de tecido caloso	SA – Ácido salicílico
GL – Graus de liberdade	SDS – Do anglo-saxónico sodium dodecyl sulphate – Mono dodecil sulfato de sódio ou lauril sulfato de sódio
GMPc – Guanosina monofosfato cíclico	Sig. – Significância
g.p.f. – Grama de peso fresco	Sig. asympt. – Significância assintótica
H1000 – Estirpe de <i>Phytophthora cinnamomi</i> oferecida pela Dra. Adrienne Hardham (Plant Cell Biology Group, Research School of Biological Science, Australian National University)	syn. - Sinonímia
HEPES - ácido <i>N</i> -2-hidroxiethylpiperazina- <i>N</i> -2-etanessulfónico	TBE – Tris-borato-EDTA (90 mM Tris-HCl; 90 mM ácido bórico; 2 mM EDTA; pH 8,3)
HMGR – Redutase da hidroximetilglutaril CoA	TCA – Do anglo-saxónico trichloroacetic acid – ácido tricloro-acético
HR – Do anglo saxónico hypersensitive response – Resposta hipersensível	TE – Tris-EDTA
IAA – Ácido indol 3-acético	TEMED – N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamino
IBA – Ácido indol 3-butírico	UV – Ultravioleta, radiação
IC – Intervalo de Confiança	v/v – Volume/volume
IMI 077375 – Estirpe de <i>Phytophthora cinnamomi</i> obtida por compra ao International Mycological Institute (IMI)	vs – versus
JA – Ácido jasmónico	Vsp – Fosfatase ácida das proteínas de armazenamento vegetativo
LI – Limite Inferior	WPM – Meio de cultura de Lloyd e McCown
Lox – Lipoxigenase	WPMM – Meio de cultura de Lloyd e McCown modificado
LS – Limite Superior	Zea – Zeatina; 6-(4-hidroxi-3-metil-but-2-enilamino) purina
MANOVA – Do Anglo-Saxónico Multivariate Analysis of Variance – Análise Multivariada de Variâncias	χ – Média
MES – ácido 2-(<i>N</i> -morfolino)etanessulfónico	Tris HCl – Hidrocloreto de 2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol ou Hidrocloreto de tris (hidroximetil) aminometano
MET – Microscopia electrónica de transmissão	2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
MM – Massa molecular	TAE – Tris-acetato-EDTA (40mM Tris acetato, 2 mM EDTA, pH 8,5)
MS – Murashige e Skoog, meio de cultura de	

ÍNDICE GERAL:

INTRODUÇÃO GERAL	33
1.CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES EM ESTUDO	35
1.1. INTRODUÇÃO	35
1.2. QUERCUS SUBER L.....	36
1.2.1. Descrição da Espécie.....	36
1.2.2. Distribuição da Espécie.....	37
1.2.3. Importância Económica.....	39
1.2.4. Factores que têm Contribuído para o Declínio do Montado	39
1.2.4.1. Acção do Homem	40
1.2.4.2. Condições do solo	40
1.2.4.3. Acção de pragas.....	42
1.2.4.4. Acção de fungos.....	43
1.2.4.5. Outras causas do declínio	44
1.3. PHYTOPHTHORA CINNAMOMI RANDS	46
1.3.1. Introdução a Phytophthora	46
1.3.2. Descrição da Espécie.....	48
1.3.3. Características de Phytophthora cinnamomi.....	49
1.3.4. Ciclo de Vida de Phytophthora cinnamomi	50
1.3.5. Distribuição da Espécie	51
1.3.5.1. No Globo	51
1.3.5.2. América	53
1.3.5.3. Europa	53
1.3.5.4. Península Ibérica	54
1.3.6. Controlo e Detecção.....	57
1.3.7. Patogenicidade de Phytophthora cinnamomi em Relação a Quercus suber.....	60
1.4. CONCLUSÃO.....	61
2.INDUÇÃO E MANUTENÇÃO DE CULTURAS IN VITRO DE QUERCUS SUBER	63
2.1. INTRODUÇÃO	63
2.1.1. Desinfecção Superficial	64
2.1.2. Meios de Cultura	66
2.1.3. Fonte de Carbono e Forma de Suporte	68
2.1.4. Potencial Hidrogeniónico, Condições Esterilização dos Meios de Cultura e de Incubação	70
2.1.5. Reguladores de Crescimento.....	71
2.1.6. Regeneração In Vitro.....	75
2.2. METODOLOGIA	77
2.2.1. Condições de Colheita, Transporte, Armazenagem e Origem do Material Vegetal	77
2.2.2. Origem do Material Vegetativo Jovem	77
2.2.3. Origem Material Vegetativo Adulto.....	78
2.2.4. Métodos de Desinfecção Superficial do Material Vegetal	79
2.2.5. Condições de Esterilização	80
2.2.6. Condições de Cultura	80
2.2.6.1. Meios de Cultura.....	80
a. Escolha dos Meios de Cultura	80
b. Preparação de soluções-mãe e meios de cultura	81

2.2.6.2. Tipo de explante e orientação.....	83
2.2.6.3. Métodos para indução e manutenção de porções aéreas	83
2.2.6.4. Métodos para indução e plântulas.....	84
2.2.6.5. Métodos para indução e manutenção de tecido caloso	84
2.2.6.6. Transferência para meio novo	84
2.2.7. <i>Recolha e Tratamento de Dados</i>	85
2.3. RESULTADOS	86
2.3.1. <i>Avaliação Qualitativa das Culturas In Vitro</i>	86
2.3.2. <i>Avaliação Quantitativa da Eficácia dos Meios de Cultura Utilizados</i>	89
2.3.3. <i>Avaliação Quantitativa da Eficácia do Tipo de Explante Utilizado</i>	91
2.3.5. <i>Avaliação Quantitativa da Eficácia dos Métodos de Desinfecção Superficial do Material Vegetal</i>	93
2.3.5.1. Contaminação.....	93
2.3.5.2. Enegrecimento.....	95
2.3.5.3. Formação de Tecido Caloso.....	96
2.3.5.4. Formação de Porção Aérea.....	97
2.3.5.4. Formação de Raiz	98
2.3.4. <i>Avaliação Quantitativa da Eficácia do Método para Indução de Plântulas</i>	98
2.4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	100
3. MANUTENÇÃO, CULTURA, ESPORULAÇÃO E PATOGENICIDADE DE <i>PHYTOPHTHORA CINNAMOMI</i>.....	105
3.1. INTRODUÇÃO	105
3.1.1. <i>Manutenção e Cultura de <i>Phytophthora cinnamomi</i></i>	105
3.1.2. <i>Esporulação de <i>Phytophthora cinnamomi</i></i>	106
3.1.2.1. Potencial hídrico	107
3.1.2.2. Arejamento	107
3.1.2.3. Temperatura	108
3.1.2.4. Volume de cultura.....	108
3.1.2.5. Esteróides.....	108
3.1.2.6. Sais minerais e iões.....	109
3.1.2.7. Extracto de solo e microrganismos.....	109
3.1.2.8. Luz.....	109
3.1.2.9. Idade da cultura	110
3.1.2.10. pH.....	110
3.1.2.11. Duração da produção de esporângios.....	110
3.1.2.12. Germinação de esporângios.....	111
3.1.2.13. Mobilidade duração dos zoósporos	111
3.1.2.14. Germinação dos zoósporos	112
3.1.3. <i>Infecção</i>	113
3.2. METODOLOGIA	114
3.2.1. <i>Origem do Material Fúngico</i>	114
3.2.2. <i>Metodologia Aplicada a <i>Phytophthora cinnamomi</i></i>	114
3.2.2.1. Cultura de <i>P. cinnamomi</i>	114
a. Preparação de meio de PDA	115
b. Preparação dos meios de sumo V8	115
c. Preparação de meio V8A a 10%	115
d. Preparação de meio V8B a 5%	115
e. Preparação de meio V8B a 1%	115
3.2.2.2. Métodos para obtenção de zoósporos de <i>P. cinnamomi</i>	116
a. Método de BYRT e GRANT (1979) para produção de zoósporos	116
b. Método de CHAMBERS <i>et al.</i> (1995) para produção de zoósporos	116
i. Preparação de solução de sais minerais de Chen e Zentmyer (DEARNALEY <i>et al.</i> , 1996)	117
ii. Preparação de extracto de solo estéril (CHAMBERS <i>et al.</i> , 1995).....	117
iii. Preparação quantificação da densidade de <i>inoculum</i>	117

iv. Preparação de meio V8B a 1% para contagem indirecta de zoósporos (NMP)	118
3.2.3. Testes de Patogenicidade	118
3.2.4. Recolha e Tratamento dos Dados	118
3.3. RESULTADOS	120
3.3.1. Manutenção, Esporulação e Libertação de Zoósporos	120
3.3.2. Densidade de Inoculum	125
3.3.3. Produção de Zoósporos	126
3.3.4. Testes de Patogenicidade	127
3.4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	132
4. AVALIAÇÃO DA INTERACÇÃO NO SISTEMA DE CULTURA DE TECIDO CALOSO	135
4.1. INTRODUÇÃO	135
4.1.1. Culturas de tecidos calosos/fitopatologia	135
4.1.2. Reguladores de Crescimento	138
4.1.3. Importância dos Reguladores de Crescimento no Processo de Infecção	138
4.1.4. Alterações Estruturais e Ultrastruturais	139
4.1.5. Resistência e Susceptibilidade	140
4.2. METODOLOGIA	142
4.2.1. Triagem de Clones Resistentes e Susceptíveis	142
4.2.3. Métodos para Obtenção de Zoósporos	142
4.2.4. Método de Inoculação	142
4.2.5. Quantificação da Densidade de Inoculum	143
4.2.6. Recolha do Material Biológico	143
4.2.7. Fixação do Material Biológico para Observação por Microscopia Electrónica de Transmissão (MET)	144
4.2.8. Recolha e Tratamento dos Dados	145
4.3 RESULTADOS	146
4.3.1. Avaliação Qualitativa da Invasão Fúngica Sobre Tecido Caloso	146
4.3.2. Triagem de Clones “Susceptíveis” e “Resistentes”	147
4.3.3. Taxas de Crescimento do Tecido Caloso Sob Diferentes Regimes de Fitorreguladores	150
4.3.3. Avaliação Ultrastrutural de Tecido Caloso Resistente e Susceptível Infectado	152
4.4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	155
5. CONDICIONAMENTO HORMONAL DA RESISTÊNCIA EM CULTURAS DE TECIDOS CALOSO	159
5.1. INTRODUÇÃO	159
5.1.1. Resposta das Plantas Face aos Agentes Patogénicos	160
5.1.1.1. Fluxos de iões/canais/bombas/ Ca^{2+}	162
5.1.1.2. Explosão oxidativa	163
5.1.1.3. Óxido nítrico	163
5.1.1.4. Ácido salicílico	163
5.1.1.5. Ácido jasmónico e jasmonato	164
5.1.1.6. Ácido oxálico e oxalato	166
5.1.1.8. A transmissão de sinal	167
5.1.1.9. Proteínas de defesa e proteínas indutoras de sinal	170
5.2. METODOLOGIA	172
5.2.1. Condições de Cultura e de Inoculação	172

5.2.2. Meios de Cultura Utilizados para o Tecido Caloso	172
5.2.3. Análises por Electroforese Capilar	173
5.2.3.1. Preparação do material biológico para análise	173
5.2.3.2. Preparação dos padrões	173
5.2.3.3. Electroforese capilar de aniões	174
5.2.3.4. Electroforese capilar de catiões	174
5.2.4. Extracção de Proteínas	174
5.2.5. Procedimentos para a Elaboração de Geles de Poli-Acrilamida	175
5.2.6. Condições da Electroforese em SDS-PAGE	176
5.2.7. Recolha e Tratamento de Dados	178
5.2.7.1. Cotação do crescimento fúngico	178
5.2.7.2. Electroforese capilar de catiões	179
5.2.7.3. Electroforese em gel de poli-acrilamida	180
5.2.7.4. Validade e fiabilidade dos testes estatístico	182
5.3. RESULTADOS	182
5.3.1. Cotações do Crescimento Fúngico Sobre Tecido Caloso (Resistente e Susceptível) Submetido a Regimes Hormonais Diferenciados	182
5.3.2. Avaliação Quantitativa dos Iões Analisados por Electroforese Capilar	186
5.3.2.1. Concentração em NH_4^+	187
5.3.2.3. Concentração em K^+	189
5.3.2.3. Concentração em Ca^{2+}	191
5.3.2.4. Concentração em Na^+	194
5.3.2.5. Concentração em Mg^{2+}	196
5.3.2.6. Concentração em Cl^-	199
5.3.2.7. Concentração em NO_2^-	201
5.3.2.8. Concentração em SO_4^{2-}	204
5.3.2.9. Concentração em NO_3^-	206
5.3.2.10. Concentração em Oxalato	208
5.3.2.11. Concentração em F^-	211
5.3.2.12. Concentração em HPO_4^{2-}	213
5.3.2.13. Correlações canónicas entre as concentrações dos iões e as variáveis independentes	215
5.3.3. Avaliação Quantitativa dos Perfis Peptídicos	217
5.3.3.1. Total do número de bandas	217
5.3.3.2. Número de bandas entre 205 a 100 kDa	221
5.3.3.3. Número de bandas entre 100 a 60 kDa	225
5.3.3.4. Número de bandas entre 60 a 40 kDa	227
5.3.3.5. Número de bandas entre 40 a 13 kDa	230
5.3.3.6. Número de bandas entre 13 a 5 kDa	233
5.3.4. Correlações entre as Concentrações em Iões e os Perfis Peptídicos	238
5.3.5. Análise de Componentes Principais	239
5.4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	240
CONCLUSÃO FINAL	251
BIBLIOGRAFIA	265
ANEXO I	281
ANEXO II	285
ANEXO III	289
ANEXO IV	293
ANEXO V	297

ÍNDICE DE TABELAS:

Tabela 1-1: Descrição dos parâmetros característicos da espécie <i>Quercus suber</i>	36
Tabela 1-2: Breve história da doença dos sobreiros em Portugal.....	56
Tabela 2-1: Quadro resumo das metodologias utilizadas por diferentes autores para a desinfecção de órgãos e tecidos de <i>Quercus suber</i> e <i>Q. robur</i>	65
Tabela 2-2: Resumo dos meios de cultura utilizados por diferentes autores para as espécies de <i>Quercus</i>	67
Tabela 2-3: Resumo das fontes de carbono e formas de suporte utilizadas pelos diferentes autores nas culturas <i>in vitro</i> de espécies de <i>Quercus</i>	69
Tabela 2-4: Resumo dos valores de pH, condições de esterilização dos meios de cultura e de incubação utilizados pelos diferentes autores nas culturas <i>in vitro</i> de espécies de <i>Quercus</i>	70
Tabela 2-5: Auxinas comumente utilizadas, suas abreviaturas e designação química.	72
Tabela 2-6: Citocininas comumente utilizadas, suas abreviaturas e designação química.	73
Tabela 2-7: Composição dos meios GDMFL e WPMM.	81
Tabela 2-8: Reguladores de crescimento dos meios otimizados para indução e manutenção dos vários tipos de culturas.	82
Tabela 2-9: Correspondência do nível de significância com o resultado do teste estatístico e com a sinalética utilizada na apresentação de resultados.	86
Tabela 2-10: Percentagens relativas de Enegrecimento, Formação de tecido caloso, Formação de parte aérea e Formação directa de raiz nos meios GDMFL e WPMM.	90
Tabela 2-11: Teste de Kruskal-Wallis não-paramétrico entre o Tipo de Meio (GDMFL e WPMM) e o Enegrecimento, Formação de Tecido caloso e Formação de Porção Aérea.....	90
Tabela 2-12: Percentagens relativas de Contaminação, Enegrecimento, Formação de tecido caloso, Formação de parte aérea e Formação directa de raiz ao fim de 28 dias de incubação em função do tipo de explante experimentado.	92
Tabela 2-13: Teste de Kruskal-Wallis não-paramétrico entre os grupos tipo de explante versus Contaminação, Enegrecimento, Formação de tecido caloso e Formação de parte aérea ao fim de 28 dias de incubação (intervalo de confiança de 95%). ^{a,b} ..	93
Tabela 2-14: Percentagem de contaminação ao fim de 28 dias de cultura dos explantes utilizando dois métodos de desinfecção de superfície e três tempos de exposição.	94
Tabela 2-15: Teste de Wilcoxon para a contaminação por comparação dos dois métodos de desinfecção de superfície (Hipoclorito de Sódio e Peróxido de Hidrogénio), quando foram utilizados três tempos de exposição.	94
Tabela 2-16: Percentagem de Enegrecimento ao fim de 28 dias de cultura dos explantes utilizando dois métodos de desinfecção de superfície e três tempos de exposição.	95
Tabela 2-17: Teste de Wilcoxon para o Enegrecimento por comparação dos dois métodos de desinfecção de superfície (Hipoclorito de Sódio e Peróxido de Hidrogénio), quando foram utilizados três tempos de exposição.	95

Tabela 2-18: Percentagem de formação de tecido caloso ao fim de 28 dias de cultura dos explantes utilizando dois métodos de desinfecção de superfície e três tempos de exposição.	96
Tabela 2-19: Teste de Wilcoxon para a formação de tecido caloso por comparação dos dois métodos de desinfecção de superfície (Hipoclorito de Sódio e Peróxido de Hidrogénio), quando foram utilizados três tempos de exposição.	97
Tabela 2-20: Percentagem de formação de porção aérea ao fim de 28 dias de cultura dos explantes utilizando dois métodos de desinfecção de superfície e três tempos de exposição.	97
Tabela 2-21: Teste de Wilcoxon para a formação de porção aérea caloso por comparação dos dois métodos de desinfecção de superfície (Hipoclorito de Sódio e Peróxido de Hidrogénio), quando foram utilizados três tempos de exposição.	98
Tabela 3-1: Correspondência do nível de significância com o resultado do teste estatístico e com a sinalética utilizada na apresentação de resultados.	120
Tabela 3-2: Número de zoósporos.mL ⁻¹ obtido para as duas estirpes de <i>Phytophthora cinnamomi</i> pelos métodos de CHAMBERS <i>et al.</i> (1995) e BYRT e GRANT (1979).	125
Tabela 3-3 – Prova de Mann-Whitney para o tipo de isolado e para o método de produção de Zoósporos.	127
Tabela 4-1: Correspondência do nível de significância com o resultado do teste estatístico e com a sinalética utilizada na apresentação de resultados.	146
Tabela 4-2: Composição auxina/citocinina para análise da contribuição dos reguladores de crescimento nos mecanismos de resistência.	150
Tabela 4-3: Teste de Kruskal–Wallis para o incremento do peso fresco (%) do tecido resistente e susceptível ao fim de 28 dias de crescimento em função do tipo de meio e do tipo de clone.	151
Tabela 5-1: Composição auxina/citocinina para análise da contribuição dos reguladores de crescimento nos mecanismos de resistência.	172
Tabela 5-2: Preparação de 5 mL de gel de concentração. Foram experimentadas duas concentrações de gel (4 e 18% de monómero).	177
Tabela 5-3: Preparação de 10 mL de gel de resolução. Foram experimentadas várias concentrações de gel (7,5 a 18% de monómero).	177
Tabela 5-4: Composição dos padrões de pesos moleculares utilizados nas separações de SDS PAGE.	178
Tabela 5-5: Correspondência do nível de significância com o resultado do teste estatístico e com a sinalética utilizada na apresentação de resultados.	182
Tabela 5-6: Estatística descritiva absoluta para as concentrações dos iões analisados por Electroforese Capilar no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado.	186
Tabela 5-7: Estatística descritiva da concentração em NH ₄ ⁺ (µg/g.p.f.) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.	187
Tabela 5-8: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis concentração em NH ₄ ⁺ (µg/g.p.f.) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.	189
Tabela 5-9: Estatística descritiva da concentração em K ⁺ (µg/g.p.f.) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.	189
Tabela 5-10: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis concentração em K ⁺ (µg/g.p.f.) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.	191

Tabela 5-11: Estatística descritiva da concentração em Ca^{2+} ($\mu\text{g/g.p.f.}$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.....	192
Tabela 5-12: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis concentração em Ca^{2+} ($\mu\text{g/g.p.f.}$) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.....	194
Tabela 5-13: Estatística descritiva da concentração em Na^+ ($\mu\text{g/g.p.f.}$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.....	194
Tabela 5-14: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis concentração em Na^+ ($\mu\text{g/g.p.f.}$) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.....	196
Tabela 5-15: Estatística descritiva da concentração em Mg^{2+} ($\mu\text{g/g.p.f.}$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.....	197
Tabela 5-16: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis concentração em Mg^{2+} ($\mu\text{g/g.p.f.}$) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.....	199
Tabela 5-17: Estatística descritiva da concentração em Cl^- ($\mu\text{g/g.p.f.}$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.....	199
Tabela 5-18: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis concentração em Cl^- ($\mu\text{g/g.p.f.}$) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.....	201
Tabela 5-19: Estatística descritiva da concentração em NO_2^- ($\mu\text{g/g.p.f.}$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.....	202
Tabela 5-20: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis concentração em NO_2^- ($\mu\text{g/g.p.f.}$) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.....	203
Tabela 5-21: Estatística descritiva da concentração em SO_4^{2-} ($\mu\text{g/g.p.f.}$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.....	204
Tabela 5-22: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis concentração em SO_4^{2-} ($\mu\text{g/g.p.f.}$) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.....	206
Tabela 5-23: Estatística descritiva da concentração em NO_3^- ($\mu\text{g/g.p.f.}$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.....	206
Tabela 5-24: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis concentração em NO_3^- ($\mu\text{g/g.p.f.}$) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.....	208
Tabela 5-25: Estatística descritiva da concentração em Oxalato ($\mu\text{g/g.p.f.}$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.....	209
Tabela 5-26: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis concentração em Oxalato ($\mu\text{g/g.p.f.}$) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.....	210
Tabela 5-27: Estatística descritiva da concentração em F^- ($\mu\text{g/g.p.f.}$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.....	211
Tabela 5-28: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis concentração em F^- ($\mu\text{g/g.p.f.}$) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.	213
Tabela 5-29: Estatística descritiva da concentração em HPO_4^{2-} ($\mu\text{g/g.p.f.}$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.....	213

Tabela 5-30: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis concentração em HPO_4^{2-} ($\mu\text{g/g.p.f.}$) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.	215
Tabela 5-31: Correlações canónicas.	216
Tabela 5-32: Médias relativas ao número total de bandas, nos tecidos calosos (resistente e susceptível), infectados, a crescerem em nove meios de cultura.	218
Tabela 5-33: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis número total de bandas e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.	220
Tabela 5-34: Taxa de decréscimo do número total de bandas no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.	220
Tabela 5-35: Prova não paramétrica de Wilcoxon para os pares de variáveis Taxa de decréscimo do número total de bandas e Tipo de meio de cultura ou Tipo de Clone.	221
Tabela 5-36: Estatística descritiva absoluta para o número de bandas de péptidos nos tecidos calosos (susceptível e resistente) infectados.	222
Tabela 5-37: Médias relativas ao número de bandas para a primeira classe de pesos moleculares (100-205 kDa) nos tecidos calosos (resistente e susceptível) infectados a crescerem em nove meios de cultura.	223
Tabela 5-38: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis número de bandas para a primeira classe de pesos moleculares (100-205 kDa) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.	225
Tabela 5-39: Médias relativas ao número de bandas para a segunda classe de pesos moleculares (60-100 kDa) nos tecidos calosos (resistente e susceptível) infectados a crescerem em nove meios de cultura.	225
Tabela 5-40: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis número de bandas para a segunda classe de pesos moleculares (60-100 kDa) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.	227
Tabela 5-41: Médias relativas ao número de bandas para a terceira classe de pesos moleculares (40-60 kDa) nos tecidos calosos (resistente e susceptível) infectados a crescerem em nove meios de cultura.	228
Tabela 5-42: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis número de bandas para a terceira classe de pesos moleculares (40-60 kDa) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.	230
Tabela 5-43: Médias relativas ao número de bandas para a quarta classe de pesos moleculares (13-40 kDa) nos tecidos calosos (resistente e susceptível) infectados a crescerem em nove meios de cultura.	230
Tabela 5-44: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis número de bandas para a quarta classe de pesos moleculares (13-40 kDa) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.	232
Tabela 5-45: Médias relativas ao número de bandas para a quinta classe de pesos moleculares (5-13 kDa) nos tecidos calosos (resistente e susceptível) infectados a crescerem em nove meios de cultura.	233
Tabela 5-46: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis número de bandas para a quinta classe de pesos moleculares (5-13 kDa) e a cotação do	

crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.	235
Tabela 5-47: Correlações estatísticas entre o número de bandas dos perfis peptídeos e as concentrações em iões.....	239
Tabela 5-48: Análise de Componentes Principais	240
Tabela 0-1: Índice de NMP.....	299

ÍNDICE DE FIGURAS:

Fig. 1-1: Fitogeografia da floresta de <i>Quercus suber</i> L..	37
Fig. 1-2: Distribuição de <i>Phytophthora cinnamomi</i> no globo.	52
Fig. 1-3: Distribuição de locais de doença amostrados para <i>Phytophthora cinnamomi</i> em Espanha e Portugal.	55
Fig. 1-4: Esquema de detecção e identificação de <i>Phytophthora cinnamomi</i> .	59
Fig. 2-1: Balanço entre a concentração de auxina e citocinina, necessário para a obtenção de diferentes respostas morfogénicas.	74
Fig. 2-2: Plantas juvenis germinadas a partir de landes.	78
Fig. 2-3: Material vegetativo de origem adulta.	79
Fig. 2-4: Aspecto da indução de crescimento de gomos axilares.	87
Fig. 2-5: Aspecto da indução de crescimento de gomos axilares.	87
Fig. 2-6: Aspecto do crescimento de tecido caloso em segmentos de entrenó.	88
Fig. 2-7: Aspecto do enraizamento de <i>Q. suber</i> .	89
Fig. 3-1: Ciclo de vida de <i>Phytophthora cinnamomi</i> .	112
Fig. 3-2: Aspecto geral do crescimento ao fim de oito dias em meio V8A a 5% dos isolados.	121
Fig. 3-3: Aspecto geral das hifas coraliformes de <i>Phytophthora cinnamomi</i> .	121
Fig. 3-4: Aspecto geral da produção de esporângios	122
Fig. 3-5: Aspecto particular de esporângios funcionais.	123
Fig. 3-6: Deiscência de um esporângio e libertação de zoósporos.	123
Fig. 3-7: Aspecto de várias fases de desenvolvimento dos zoósporos e quistos.	124
Fig. 3-8: Exemplares de <i>Q. suber</i> apresentando alguma sintomatologia associada à infecção por <i>P. cinnamomi</i> , após 7 dias de incubação.	128
Fig. 3-9: Crescimento radicular negativo e positivo.	129
Fig. 3-10: Teste de patogenicidade: aspecto geral das plantas controlo, após 7 dias.	131
Fig. 3-11: Teste de patogenicidade: aspecto geral das plantas infectadas, após 7 dias.	131
Fig. 4-1: Colocação na zona central da massa de tecido caloso, de um disco (3 mm de diâmetro) de papel de filtro estéril.	143
Fig. 4-2: Esquema representativo da recolha das amostras em três zonas distintas	144
Fig. 4-3: Aspecto de várias gradações de crescimento fúngico em clones diferentes.	147
Fig. 4-4: Aspecto de tecido caloso resistente ao longo de sete dias de incubação com 10 µL de uma suspensão de zoósporos de <i>P. cinnamomi</i> .	149
Fig. 4-5: Aspecto de tecido caloso susceptível ao longo de sete dias de incubação com 10 µL de uma suspensão de zoósporos de <i>P. cinnamomi</i> .	149
Fig. 4-6: Aspecto de tecido caloso controlo resistente (A) e susceptível (B).	150
Fig. 4-7: Aspecto geral de células de tecido caloso não infectadas.	152
Fig. 4-8: Aspecto geral de células de tecido caloso em interacção com células de <i>P. cinnamomi</i> .	154

Fig. 4-9: Aspecto geral de células de tecido caloso em interacção com células de <i>P.cinnamomi</i> .	153
Fig. 5-1: Síntese de ácido jasmónico a partir do ácido linoleico em resposta aos sinais de desenvolvimento e ambientais.	165
Fig. 5-2: O diagrama mostra duas vias possíveis para a síntese do ácido jasmónico.	166
Fig. 5-3: Modelo de funcionamento da competência para a indução de sinal.	169
Fig. 5-4: Modelo de estabelecimento da competência e potenciamento da defesa.	170
Fig. 5-5: Variação para a cotação do crescimento fúngico sobre tecido caloso susceptível, mantido em nove meios de cultura com composição auxina:citocinina diferente.	184
Fig. 5-6: Variação para a cotação do crescimento fúngico sobre tecido caloso resistente, mantido em nove meios de cultura com composição auxina:citocinina diferente.	185
Fig. 5-7: Distribuição da concentração em NH_4^+ ($\mu\text{g/g.p.f.}$) em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura.	188
Fig. 5-8: Distribuição da concentração em K^+ ($\mu\text{g/g.p.f.}$) em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura.	190
Fig. 5-9: Distribuição da concentração em Ca^{2+} ($\mu\text{g/g.p.f.}$) em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura.	193
Fig. 5-10: Distribuição da concentração em Na^+ ($\mu\text{g/g.p.f.}$) em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura.	195
Fig. 5-11: Distribuição da concentração em Mg^{2+} ($\mu\text{g/g.p.f.}$) em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura.	198
Fig. 5-12: Distribuição da concentração em Cl^- ($\mu\text{g/g.p.f.}$) em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura.	200
Fig. 5-13: Distribuição da concentração em NO_2^- ($\mu\text{g/g.p.f.}$) em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura.	203
Fig. 5-14: Distribuição da concentração em SO_4^{2-} ($\mu\text{g/g.p.f.}$) em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura.	205
Fig. 5-15: Distribuição da concentração em NO_3^- ($\mu\text{g/g.p.f.}$) em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura.	207
Fig. 5-16: Distribuição da concentração em Oxalato ($\mu\text{g/g.p.f.}$) em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura.	210
Fig. 5-17: Distribuição da concentração em F^- ($\mu\text{g/g.p.f.}$) em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura.	212
Fig. 5-18: Distribuição da concentração em HPO_4^{2-} ($\mu\text{g/g.p.f.}$) em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura.	214
Fig. 5-19: Distribuição do número de bandas nos perfis peptídicos para o número total de bandas em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura.	219
Fig. 5-20: Distribuição do número de bandas nos perfis peptídicos para a classe de pesos moleculares entre 100 e 205 kDa em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura.	224
Fig. 5-21: Distribuição do número de bandas nos perfis peptídicos para a classe de pesos moleculares entre 60 e 100 kDa em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura.	226

Fig. 5-22: Distribuição do número de bandas nos perfis peptídicos para a classe de pesos moleculares entre 40 e 60 kDa em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura.....	229
Fig. 5-23: Distribuição do número de bandas nos perfis peptídicos para a classe de pesos moleculares entre 13 e 40 kDa em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura.....	232
Fig. 5-24: Distribuição do número de bandas nos perfis peptídicos para a classe de pesos moleculares entre 5 e 13 kDa em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura.....	234
Fig. 0-1: Árvore filogenética mostrando as relações entre os principais grupo de eucariotas.....	283
Fig. 0-2: Distribuição geográfica das regiões de origem das landes e do material adulto. ..	287

ÍNDICE DE GRÁFICOS:

Gráfico 2-1: Percentagem de enraizamento a fim de 7 dias de crescimento.....	99
Gráfico 2-2: Número médio de raízes por rebento ao fim de 7 dias de crescimento.....	99
Gráfico 3-1: Representação dos valores médios e do desvio padrão associado para o NMP em dois métodos de produção de zoósporos.....	126
Gráfico 3-2: Observação de sintomatologia associada à infecção por duas estirpes de <i>P. cinnamomi</i> em plântulas de <i>Q. suber</i> , durante um período de 7 dias.....	130
Gráfico 4-1: Representação dos valores para a cotação do crescimento fúngico em dois clones: 702 e 484 ao fim de sete dias de incubação com <i>P. cinnamomi</i>	148
Gráfico 4-2: Representação do incremento do peso fresco (%) do tecido resistente e susceptível ao fim de 28 dias de crescimento.	151
Gráfico 5-1: Representação das correlações canónicas entre as concentrações dos iões e as variáveis independentes.	217
Gráfico 5-2: Distribuição da taxa de decréscimo do número de bandas nos perfis peptídicos para cinco classes de pesos moleculares e para a totalidade dos geles de SDS-PAGE.	236

INTRODUÇÃO GERAL

O sobreiro é uma espécie florestal com grande interesse económico para Portugal. Ciclicamente surgem relatos de pragas e doenças que afectam a mancha florestal de sobreiro e que, inevitavelmente, contribuem para uma diminuição da produtividade agro-industrial afectada à exploração desta árvore. Os investidores nesta área começam agora a preocupar-se com o flagelo que, pelo menos, desde o século XIX, vem preocupando diversos investigadores.

Fundamentadamente, em 1993, BRASIER *et al.*, prognosticaram, a interacção entre *Quercus suber* e *Phytophthora cinnamomi* na Península Ibérica.

Os estudos acerca da susceptibilidade/resistência de *Quercus suber* L. à infecção por *Phytophthora cinnamomi* e dos mecanismos envolvidos na relação entre hospedeiro-parasita revestem-se de utilidade, dada a concepção da necessidade em preservar o montado e do bosque mediterrânico. Apesar dos reiterados estudos acerca da interacção entre estas duas espécies há, ainda, espaço para alguns esclarecimentos, mormente, acerca do potencial patogénico de *P. cinnamomi* em relação a *Q. suber*, dos mecanismos de resistência e de susceptibilidade, das biomoléculas e iões envolvidos na interacção, das modificações ultrastuturais, da síntese *de novo*, entre outros. Com o intuito de contribuir para o esclarecimento da relação *Q. suber*-*P. cinnamomi*, foi utilizada a metodologia de estudo da interacção *in vitro* entre *Q. suber* e *P. cinnamomi*, com a aplicação subsequente de várias metodologias analíticas desenvolvidas de forma a compreender alguns dos mecanismos envolvidos na relação entre este hospedeiro e este parasita.

O trabalho escrito está dividido em cinco capítulos. No primeiro capítulo apresenta-se a descrição das duas espécies em estudo, do ponto de vista taxonómico, da distribuição/dispersão geográfica e da importância económica. Na secção reservada à espécie vegetal apontam-se alguns factores que têm contribuído para o declínio desta árvore no bosque mediterrâneo, sobretudo na segunda metade do século XX. Na secção reservada ao agente patogénico, além dos aspectos supracitados, sublinham-se as recentes orientações europeias para a detecção deste agente patogénico bem como algumas medidas profiláticas possíveis.

No segundo capítulo apresenta-se as metodologias de crescimento *in vitro* (indução e manutenção de culturas) de *Quercus suber*, apresentam-se os resultados da aplicação de técnicas e métodos diferenciados para a obtenção destas culturas que fundamentam as escolhas dos métodos utilizados nos terceiro, quarto e quinto capítulos.

No terceiro capítulo apresentam-se metodologias de manutenção, cultura e esporulação de *Phytophthora cinnamomi*, os testes de patogenicidade (relativamente às plântulas e porções aéreas micropropagadas e aos tecidos caloso obtidos anteriormente) e as observações das alterações ultrastruturais. À semelhança do que aconteceu no capítulo anterior apresentam-se os resultados da aplicação de técnicas e métodos diferenciados para a obtenção destas culturas que fundamentam as escolhas dos métodos utilizados nos capítulos quatro e cinco. Neste capítulo fundamenta-se a escolha dos clones ditos resistente e susceptível.

No quarto capítulo apresentam-se as metodologias de interacção entre o fungo patogénico e as culturas de tecido caloso obtidas a partir da espécie vegetal em estudo. As culturas de tecido caloso foram sujeitas a regimes de fitorreguladores distintos e em seguida foram infectados com o agente patogénico. Em função das observações registadas determinaram-se as variações de comportamento em função da proporção entre auxina:citocinina.

No quinto e último capítulo apresentam-se as metodologias de análise química e bioquímica empreendidas no sentido de entrever alguns mecanismos envolvidos nesta interacção. Determinaram-se as concentrações de determinados iões (aniões e catiões) com possível interferência no processo da patogénese em função da resistência ou da susceptibilidade dos tecidos. Neste capítulo estudaram-se, ainda, os perfis peptídicos da interacção *in vitro* de *Quercus suber* (clones susceptíveis e resistentes) relativamente a *Phytophthora cinnamomi*.

Por último, apresentam-se em jeito de epílogo, os principais resultados, conclusões do estudo e perspectivas futuras de estudo.

1. CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES EM ESTUDO

1.1. INTRODUÇÃO

Neste trabalho estudou-se a interacção entre *Quercus suber* e *Phytophthora cinnamomi*, que é uma relação entre hospedeiro e parasita.

A espécie vegetal, hospedeira, vem sendo estudada intensamente no último século dada a sua importância económica e ambiental.

Nas últimas décadas o parasita *P. cinnamomi*, tem sido apontado, como um dos factores de declínio de inúmeras espécies florestais, nomeadamente, de espécies da família das Fagaceae.

São muitos os estudos realizados acerca da espécie *Quercus suber*, bem como, acerca do fungo *Phytophthora cinnamomi*. Estudos que relacionem as duas espécies são mais escassos, contudo, nas últimas décadas estes estudos têm aumentado, consideravelmente.

Neste capítulo, enquadram-se as duas espécies, sob o ponto de vista descritivo das suas características morfológicas específicas, da sua distribuição (*Quercus suber*) ou da sua dispersão (*Phytophthora cinnamomi*) à escala mundial e nacional e da sua importância do ponto de vista ambiental e económico.

Na secção reservada a *Quercus suber* e sem qualquer pretensão de exaustividade, apontam-se alguns factores que têm contribuído para o acentuado declínio (sobretudo na segunda metade do século XX) desta árvore no ecossistema Bosque Mediterrâneo. A maioria dos autores consultados afirmam que não existe apenas um factor o desencadeador do declínio, mas sim uma quantidade indeterminada de factores bióticos e abióticos que interdependem entre si e que contribuem para esta adversidade.

Na secção reservada ao agente patogénico, além dos aspectos supracitados, sublinham-se as recentes orientações europeias para a detecção deste agente patogénico, bem como, algumas medidas profiláticas e de tratamento possíveis.

1.2. *QUERCUS SUBER* L.

1.2.1. Descrição da Espécie

Quercus suber L. é uma árvore de dimensões consideráveis (10-15 m de altura, raras vezes 25 m), de copa ampla e algo irregular que forma bosques, por vezes de extensão considerável, em substrato silício, preferencialmente solto e permeável, raramente em terrenos rochosos, sobretudo em zonas frescas e abrigadas (FRANCO, 1990).

Na Tabela 1-1 descrevem-se, sumariamente, os parâmetros taxonómicos que caracterizam esta espécie.

Tabela 1-1: Descrição dos parâmetros característicos da espécie *Quercus suber*.
[De acordo com FRANCO (1990)]

Parâmetros		Descrição
Dimensões		Árvore de 10-15 (25) m
Copa		Ampla, algo irregular
Troncos e ramos não descortiçados		Cortiça suberosa, grossa e fendida, parda-escura
Troncos e ramos descortiçados		Dourada passando a vermelha e chegando a negra
Ramos menores		Densamente pardo-tomentosos
Gemmas		1-2 mm, pubescentes ou tomentosas
Folhas	Dimensões e características gerais	2,5-10 x 1,2-6,5 cm, coriáceas, persistentes, de ovadas ou ovado-lanceoladas a oblongas, na maioria das vezes remotamente denticuladas, nervação secundária 5-7 pares
	Face superior	Verde-escuras e glabrescentes
	Face inferior	Densamente pardo-tomentosas
	Pecíolo	(2)6-20 mm, tomentoso
Amentos masculinos		4-8 cm, de ráquis piloso
Perianto		De lóbulos ovados, pilosos
Anteras		Quase iguais ou mais largas que os estiletos
Aquénio		20-45 x 10-18 mm, de maturação anual, castanho-avermelhado na maturidade
Pedúnculo frutífero		5-40 mm rígido e tomentoso
Cúpula		10-20 mm x 12-25 mm, com as escamas inferiores ovado-triangulares, curtas, imbricadas e mais ou menos aplicadas
Cromossomas		2n=24; n=12.

A palavra *Quercus*, possivelmente, deriva do celta "Kaêr Quez" que significa bela árvore ou árvore por excelência. O restritivo genérico *Quercus* provém do Latim e significa carvalho, e o

restritivo específico *suber* significa sobreiro. A espécie *Quercus suber* L., comumente designada por sobreiro, pertence à família Fagaceae e à ordem Fagales, sendo o género a que pertence dos mais vastamente representados nas florestas autóctones do hemisfério norte (FRANCO, 1990).

A exploração desta espécie florestal reporta-se sobretudo à extracção da cortiça com o fim da produção de rolhas e derivados da cortiça (corticite, tecido, etc.). Esta planta contribui, ainda, de forma algo importante para a alimentação de gado, particularmente do porcino (FRANCO, 1990)

A floresta de *Quercus suber* (Fig. 1-1) faz parte do ecossistema Bosque Mediterrâneo, e é uma floresta de folha persistente dominada pelo sobreiro muitas vezes acompanhada por outras árvores Quercíneas (ex.: *Quercus pubescens*, *Quercus frainetto*) (BIANCO *et al.*, 2003). Esta floresta apresenta uma vegetação rasteira composta sobretudo por arbustos das quais se destacam as espécies *Stachys officinalis*, *Viola suavis*, *Smilax aspera*, e a endémica *Crocus suaveolens* (BIANCO *et al.*, 2003).

1.2.2. Distribuição da Espécie

No globo esta espécie está distribuída numa banda relativamente estreita ao longo das áreas litorais oeste da Europa (CIESLA, 2002). Na Fig. 1-1 está representada a sua distribuição geográfica no mediterrâneo.

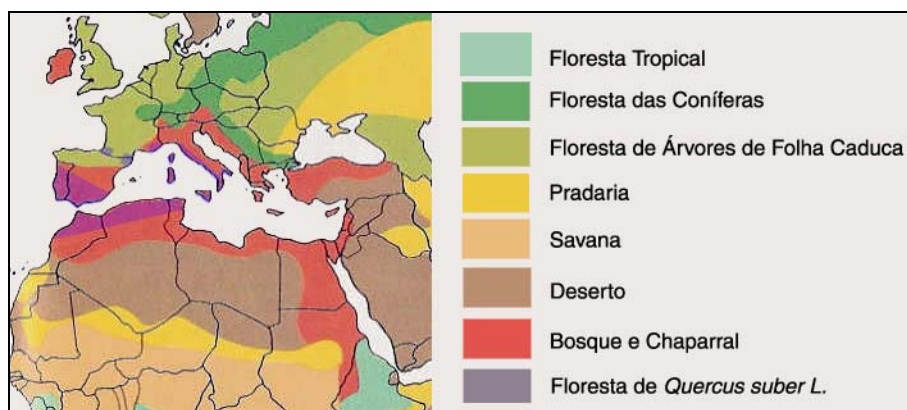


Fig. 1-1: Fitogeografia da floresta de *Quercus suber* L..

Notar a clara sobreposição da distribuição do sobreiro com o bioma bosque e chaparral (Bosque Mediterrâneo). [Adaptado de MADER (1985) e de CIESLA (2002)].

Na Europa a sua distribuição é mais concentrada a sudoeste, nos países mediterrâneos, como sejam Portugal (660 000 ha), Espanha (440 000 ha) e Itália (90 000 ha). A França

apresenta, ainda, uma percentagem apreciável desta espécie na sua mancha florestal (110 000 ha) (CIELSA, 2002).

Em França, é na região de Var (entre Cannes e Toulon) e na ilha de Córsega, que se encontram as florestas de sobreiro mais importantes (CIELSA, 2002).

No Mediterrâneo, além dos países acima citados há que referir Marrocos, Argélia e Tunísia, como países onde esta espécie está vastamente distribuída. Nestes países, sobretudo nas últimas décadas, houve incentivos ao plantio desta espécie. Em Marrocos, *Q. suber*, encontra-se, sobretudo, adstrito às faixas litorais mediterrânea e atlântica, tem uma área de distribuição de 350 000 ha e pode ser encontrado até altitudes de 2 200 m (CIELSA, 2002). As florestas de sobreiro da Argélia (460 000 ha) e da Tunísia (90 000 ha) são uma continuação da faixa florestal litoral mediterrânea de Marrocos (CIELSA, 2002).

As províncias espanholas de Badajoz, Cáceres, Cádiz, Huelva, Málaga e Sevilha são cobertas por extensas áreas de sobreiro (CIELSA, 2002).

Em Portugal, *Q. suber*, encontra-se disperso por todo o país, mas está sobretudo implantado em regiões como o Alentejo e o Algarve. Em cinco distritos (Beja, Évora, Portalegre, Santarém e Setúbal) é possível encontrar 87% dos efectivos da totalidade da cobertura de sobreiros do país (CIELSA, 2002). Em Trás-os-Montes, os montados de sobre e azinho, ocupam uma pequena área, 16 400 e 5 000 ha respectivamente, principalmente na Terra Quente (LOUREIRO e RODRIGUES, 1992). No século XX, foi possível determinar a área ocupada pelo sobreiro em Portugal, em três publicações distintas: a carta agrícola de 1902; a carta de distribuição do Sobreiro, publicada em 1960; o Inventário Florestal Nacional, com sucessivas revisões e cujos dados foram sintetizados no ano de 1988 (SAMPAIO, 1989). A distribuição da Floresta em Portugal Continental é revista, periodicamente e, os órgãos competentes prosseguem na Terceira Revisão do Inventário Florestal Nacional, com base em Fotografia Aérea. O estado do montado tem sido analisado de tempos a tempos, de diversas formas. Uma das formas tem sido a foto-interpretação diacrónica. Estes tipos de análises foram conduzidos nos anos 1958, 1969, 1989, 1995 e ainda 2001 (3.^a Revisão). Os dados mostram que de uma forma geral a área de cobertura total do montado não sofreu grandes alterações. Contudo houve uma diminuição considerável da densidade, ou seja, em áreas onde a densidade era alta passou a ser média e onde era média passou a ser baixa (SAMPAIO, 1989).

A grande importância económica da exploração desta espécie florestal, conduziu à introdução desta planta em países para além da zona mediterrânea oeste, como sejam Rússia (Região da Crimeia), Estados Unidos da América (Estado da Califórnia e outros Estados do Sul), Argentina, Austrália, Israel, Japão, África do Sul, Turquia e Uruguai, tendo, o sucesso, sido limitado (CIELSA, 2002).

1.2.3. Importância Económica

Os dados divulgados pela Direcção Geral de Florestas, referem que nos últimos anos (1998-2000) no Comércio Internacional de Produtos Florestais a cortiça teve um acervo de 50%, a pasta 30%, a madeira 10%, o papel 9% e os outros produtos florestais 1%. Ainda, segundo esta entidade oficial, a França é o país, que a nível global, apresenta o maior saldo entre a entrada e a saída de produtos florestais, seguido pela Alemanha, Reino Unido e Estados Unidos da América, sendo portanto, estes os maiores importadores mundiais, enquanto que o maior exportador mundial é a Finlândia, seguida pelo Brasil, Camarões e Marrocos. Apesar da importância da cortiça e de outros produtos florestais na economia nacional, Portugal é um país importador neste sector, segundo dados divulgados por esta entidade (www.min-dgf.pt). Daqui se depreende que, apesar da importância do sobreiro ter sido em tempos maior para a economia nacional, actualmente continua a ter relevância. Por esse motivo os estudos que abordem as temáticas relacionadas com os factores que podem contribuir para o declínio desta exploração florestal revestem-se de utilidade.

1.2.4. Factores que têm Contribuído para o Declínio do Montado

Apesar de não se saber claramente quais são os factores desencadeadores do declínio do montado, são inúmeros os estudos que estabeleceram alguns factores abióticos e bióticos como responsáveis directos ou indirectos por este fenómeno (MACHADO, 2005).

Com base nos registos históricos e dendrológicos, o declínio das Quercíneas na Europa Central, tem sido atribuído aos efeitos isolados ou combinados dos extremos climáticos (frio extremo de Inverno e seca de Verão), insectos desfolhadores e agentes patogénicos fúngicos (THOMAS *et al.*, 2002).

Além dos factores apontados, outros estudos atribuem aos factores acção do homem, condições do solo, acção de pragas e acção de agentes patogénicos diferentes dos fungos como contribuintes para o progressivo declínio do montado. Os diferentes autores consultados atribuem importâncias distintas a cada um dos factores. A maioria dos autores refere que a acção humana é, sem dúvida, aquela que mais tem concorrido para a degradação do montado, mesmo porque, muitas vezes a má utilização do montado contribui, em definitivo, para uma degradação das condições do solo ou o aumento da incidência de pragas e doenças que afectam o montado de sobreiro.

1.2.4.1. Acção do Homem

CABRAL e SARDINHA (1992), verificaram que havia uma relação positiva entre a mortalidade e os descortiçamentos exagerados e entre a mortalidade e a compactação do solo. Referiram ainda que a mortalidade nos montados seguia o padrão geral da degradação descrita para outras espécies de *Quercus* na Europa (CABRAL e SARDINHA, 1992). Feridas de descortiçamento resultantes de más práticas e/ou falta de formação profissional, a elevada intensidade de descortiçamento com efeitos graves em anos de seca e a manutenção do arvoredor morto e despojos de exploração são apontados como factores importantes que contribuem para o declínio do montado de sobreiro (CABRAL e SARDINHA, 1992).

BERNARDO *et al.* (1992) estudaram os vários tipos de cultura de sobreiro, na região do Cercal, Santiago do Cacém, uma região caracterizada por montados abertos, com pousios curtos ou montados com pastagem. Estes autores verificaram que este tipo de exploração conduz a uma forte agressão ao sobreiro: corte de raízes com a lavoura (sobretudo nas últimas décadas por utilização de alfaías potentes); arreas; descortiçamento exagerado e; outras técnicas de exploração do montado completam o quadro de agressão. Nos montados, onde prevalece o modelo silvopastoril, o sobrepastoreio e pisoteio pelo gado, principalmente nas zonas alagadiças, contribuem para o processo de degradação do montado, cooperando para a perda da autorregulação natural e o aparecimento de pragas e parasitas (BERNARDO *et al.*, 1992).

O corte das raízes nas camadas, orgânica e mineral, superficiais do solo, nas quais ocorrem as maiores disponibilidades nutritivas, diminui consideravelmente a capacidade de absorção da planta em água e nutrientes.

Mais recentemente, em 2002, BARROS *et al.*, referem a necessidade imperativa de se tomarem medidas relativamente à intervenção humana nas zonas onde, desde 1991, se tem verificado um declínio acentuado do sobreiro, recorrendo a regras técnicas de conservação para as podas, descortiçamentos, movimentação de solos e criação de gado.

1.2.4.2. Condições do solo

O *stress* provocado por factores abióticos, por si só, se for severo e prolongado, pode resultar na mortalidade dos exemplares florestais (WARGO, 2002). Relativamente aos factores abióticos algumas relações foram estabelecidas, nomeadamente: a deficiência de água no solo; um aumento da sua acidez; a deficiência ou excesso de alguns macro e micronutrientes (MACHADO, 2005). Num estudo onde foram aplicadas técnicas de análise foliar ao sobreiro, GOMES (2005) verificou que os teores foliares em nutrientes reflectiram as características do solo e a sua disponibilidade em cada montado e apresentaram diferentes relações com a desfolha e o

declínio vegetativo das árvores. Os seus resultados indicam a ocorrência de aspectos de nutrição mineral específicos em cada montado e apontam para a necessidade de desenvolver formas distintas de ocupação e de uso do solo sobcoberto, que promovam a sua sustentabilidade (GOMES, 2005).

A ocorrência de morte verifica-se, principalmente, no domínio dos solos menos espessos e que apresentavam má drenagem interna. A presença de horizonte impermeável perto da superfície reduz as condições para um bom desenvolvimento radicular – importante influência nas disponibilidades de nutrientes para a planta (BERNARDO *et al.*, 1992).

BERNARDO *et al.* (1992) verificaram a existência de correlações significativas entre a morte dos sobreiros e as concentrações médias de iões nos perfis de algumas das variáveis do solo. Neste estudo os aspectos mais salientes foram: correlações negativas significativas da morte com os teores de K^+ e Ca^{2+} em $kg\ ha^{-1}$, K_2O e percentagem de limo¹; correlações positivas da morte com o pH e a percentagem de fracção argilosa; correlações positivas dos teores de fósforo assimilável e carbono; no montado degradado eram maiores as concentrações de Al^{3+} e Fe^{2+} e baixas concentrações em P_2O_5 e Mn^{2+} (BERNARDO *et al.*, 1992).

CABRAL e SARDINHA (1992) verificaram que havia uma diminuição dos teores de potássio no solo e nas folhas e os teores de alumínio eram mais elevados nas áreas de mortalidade, verificando-se, igualmente, uma relação positiva entre a mortalidade e a acidificação do solo.

Num estudo de DELATOUR *et al.* (2001), em inspecções intensivas dos solos florestais, em metade dos locais (geralmente associados aos solos mais ácidos, onde, apesar disso, o declínio podia ser severo) não foram detectadas espécies de *Phytophthora* spp..

Recentemente, LAPEÑA e TUSET (2002), referiram os escassos conhecimentos acerca da importância da fertilização dos solos com azoto, particularmente, na interacção *Quercus-Phytophthora*. Para tal, estudaram o efeito de várias concentrações de $NH_4:NO_3$ nos zoósporos de *P. cinnamomi* e *P. parasitica* quando da infecção de *Quercus rotundifolia*. Verificaram que *P. cinnamomi* aparentava ser mais susceptível à toxicidade do fertilizante do que *P. parasitica* (LAPEÑA e TUSET, 2002).

JUNG *et al.* (2001) estudaram os efeitos de diferentes concentrações de regimes de nitrato (0,05 e 100 ppm) em água de alagamento na deterioração do sistema radicular de árvores jovens de *Quercus robur* causada por *P. cinnamomi*, *P. quercina*, *P. cambivora*, *P. citricola* e *P. syringae* aff. usando testes de infestação do solo. Verificaram que *P. cinnamomi* e *P. quercina* eram os agentes patogénicos mais agressivos, que o crescimento radicular das plantas controlo não inoculadas era estimulado, e que a diferença do comprimento das raízes finas e do número de ápices radiculares, entre as plantas controlo não inoculadas e plantas a cresceram em solo

¹ A classificação do solo segundo o diâmetro de suas partículas constituintes é a seguinte: menos de 2 μm = argila; entre 2 μm e 20 μm = silte; entre 20 μm e 50 μm = limo grosseiro; entre 50 μm e 200 μm = areia fina; entre 200 μm e 2 mm = areia grossa; entre 2 mm e 20 mm = pedregulhos; mais de 20 mm = pedras (Romeiro, 1994)

infestados, ia aumentando com o aumento das concentrações de nitrato (JUNG *et al.*, 2001). O aporte de azoto de origem antropogénica nos solos das florestas e o aumento das secas de verão são discutidos, por estes autores, como factores que despoletam o declínio dos carvalhos mediado pelas espécies de *Phytophthora* na Europa Central (JUNG *et al.*, 2001).

THOMAS *et al.* (2002) afirmaram que as condições hidromórficas locais e o excesso de azoto no solo desempenham um papel importante no declínio das Quercíneas da Europa Central em locais mais ácidos (pH 4,2). Estes autores referiram ainda que a poluição atmosférica, o stress químico do solo (incluído o excesso de manganésio) e a desproporção nutricional induzida pelo azoto não parecem ser factores importantes no complexo declínio das Quercíneas (THOMAS *et al.*, 2002)

Em 2005, MOREIRA, observou que os terrenos mais expostos a sul e com elevados teores de argila e limo apresentam um maior agravamento da doença provocada por *P. cinnamomi*. Ainda segundo esta autora, a indução de *stress* hídrico em *Q. suber* favorece o desenvolvimento desta doença, nomeadamente que a combinação do encharcamento (ou da escassez prolongada de água no solo) e a infecção com o fungo actuam sinergisticamente (MOREIRA, 2002).

1.2.4.3. Acção de pragas

Os *stresses* severos e/ou prolongados, associados aos ataques por organismos parasitas que invadem e colonizam com sucesso as árvores enfraquecidas pelo *stress* abiótico, são potencialmente letais (WARGO, 1996). Relativamente aos factores bióticos verificou-se que o declínio está intimamente associado a padrões fitossanitários complexos, nos quais tanto as pragas como as doenças desempenham, consoante os casos, papéis determinantes neste processo, conduzindo à morte do sobreiro (MACHADO, 2005).

Os insectos causadores de declínio no montado de sobreiro são agrupados nos grupos dos: desfolhadores (*Lymantria dispar* L., *Ephesia nymphae* e *Tortrix viridana* L.); xilófagos (*Cerambyx cerdo* L., *Platypus cylindrus* F. e *Coroebus florentinus*), subcorticais (*Coroebus undatus* F. e *Agrilus biguttatus* F.); corticais (*Crematogaster scutularis* Oliv.); radiculares; frutos (*Balaninus elephas* Gyll.) e; decompositores da madeira (*Reticulitermes banyulensis* e *Kaloterme flavicollis*) (BOUHARAOUA *et al.*, 2002; CHAKALI *et al.*, 2002; JAMÃA *et al.*, 2002; VANSTEENKISTEA *et al.*, 2004).

Além das pragas já conhecidas, na última década, foi indicada uma nova espécie de insectos – *Platypus cylindrus*, considerados parasitas secundários. Contudo, a sua existência no nosso país foi narrada já há muito tempo (CABRAL e SARDINHA, 1992). O seu comportamento tradicional é o de decompositor da madeira morta ou de árvores em adiantada fase de

degradação. A existência de condições favoráveis no montado permitiu a sua pululação, o que acontece de forma semelhante em Espanha e França (CABRAL e SARDINHA, 1992).

RIZIERO *et al.* (2002) relataram a importância das associações entre insectos e fungos causadores de declínio nas Quercíneas, em Itália. Estes autores isolaram (do corpo dos insectos ou de água onde tinham, previamente, imerso os insectos) vários microrganismos que se sabe contribuir para o declínio e enfatizaram que vários fungos patogénicos para estas plantas podem ser transportados pelos insectos que contribuem para o enfraquecimento destas árvores (RIZIERO *et al.*, 2002).

THOMAS *et al.* (2002) sugeriram um modelo conceptual da interacção dos factores abióticos e bióticos para o estabelecimento do declínio das Quercíneas. Este modelo poderá ser válido para as estações de Quercíneas da Europa Central em locais mais ácidos (com pH 4,2, em solos com maior valor de pH as espécies de *Phytophthora* podem contribuir para o declínio). A combinação da desfolhação severa provocada pelos insectos em pelo menos dois anos consecutivos com os extremos climáticos é o complexo mais significativo dos factores com incidência do declínio das Quercíneas (THOMAS *et al.*, 2002). Combinadas com a desfolhação, a seca de verão ou os congelamentos de Inverno/Primavera, ou ambos, têm de ocorrer no mesmo ano ou em anos consecutivos para causarem maiores prejuízos no declínio (THOMAS *et al.*, 2002).

1.2.4.4. Acção de fungos

Em 1992, CABRAL e SARDINHA detectaram seis fungos considerados potencialmente patogénicos para *Quercus suber*.

Entre os fungos que são normalmente associados ao declínio do sobreiro destacam-se *Hypoxylon mediterraneum*, *Diplodia mutila* e *Phytophthora cinnamomi*. Relativamente à descrição do último, remete-se o leitor para a secção 1.3. (pág. 46) deste capítulo.

Recentemente, em 2002, FRANCESCHINI *et al.*, numa área de declínio no Norte da Sardenha, isolaram de todos os órgãos da copa (ramos, folhas, rebentos, gemas e folhas) de vários exemplares de *Q. suber*, o fungo endófito *Biscogniauxia mediterranea* e sublinharam o elevado potencial de *inoculum* deste fungo na região.

O fungo, *Biscogniauxia mediterranea* [syn. *Hypoxylon mediterraneum* (De Not) Mill], é o causador da doença do carvão do entrecasco (SANTOS, 2003; SÁNCHEZ *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2005). É um fungo ascomiceta, da família Xilariales (PETRINI, 2003). Trata-se de um parasita das feridas e do enfraquecimento que não é específico do sobreiro (MACHADO, 2005). As circunstâncias predisponíveis aos ataques são variáveis: descortiçamentos mal efectuados, feridas diversas, passagem de incêndios, períodos de secura, entre outras (MACHADO, 2005). É

um fungo que se desenvolve na cortiça, toma a aparência de placas subcorticais de aspecto carbonizado, negras e duras, surgem a partir de fissuras longitudinais da cortiça (Machado, 2005). Actualmente a única forma de o combater é através de campanhas preventivas silvícolas, podas orientadas, protecção das zonas excisadas e incineração dos órgãos colhidos, protecção de zonas lesionadas e desinfecção dos utensílios (MACHADO, 2005).

Diplodia mutila (For) Monto é um fungo com ciclo de vida sexuado, da Divisão Deuteromycotina, Ordem Sphaeropsidales, Família Sphaerioidaceae (ALEXOPOULOS *et al.* 1996). Trata-se de um fungo oportunista, parasita secundário, destruidor que ataca as árvores feridas na altura do descortiçamento, que estão em zonas húmidas ou que estão fisiologicamente sob stress (SANCHO *et al.*, 2003).

O fungo objecto deste estudo, *Phytophthora cinnamomi*, é um parasita pioneiro, isto é, o primeiro microrganismo invasor a atacar um determinado hospedeiro, e que constitui um dos principais factores de declínio do montado. Este agente patogénico possui uma vasta gama de hospedeiros (ZENTMYER, 1983), sendo que muitas espécies da flora natural são hospedeiros de *P. cinnamomi* contribuindo para a manutenção da sua população sempre activa, constituindo um importante factor epidemiológico e dificultando o seu controlo (MOREIRA, 2005). Ainda segundo MOREIRA (2005), a susceptibilidade das plântulas de sobreiro e de azinheira (*Quercus ilex*) a *P. cinnamomi* associada à elevada quantidade de *inoculum* proporcionado pelos diferentes hospedeiros, pode também contribuir para a fraca regeneração natural nalgumas áreas de Portugal, e para o elevado insucesso na reflorestação, quer por planta, quer por sementeira directa, que se observa nos montados de algumas regiões do país (MOREIRA, 2005). A infecção iniciada na raiz propaga-se em altura, ocorrendo o aparecimento de necroses ao longo da planta (MIRCETICH *et al.*, 1977).

1.2.4.5. Outras causas do declínio

Entre os vários factores que podem ser sistematizados nesta secção destacam-se a seca, golpes de frio e de calor, condições climáticas adversas e os fogos. No último século, os dois últimos factores, são, frequentemente, associados à acção do homem.

Em termos muito gerais, define-se seca, como um período de persistência anómala de tempo seco de modo a causar problemas na agricultura, na pecuária e/ou no fornecimento de água. No que diz respeito às florestas, estes períodos de secura caracterizam-se por um enfraquecimento geral das árvores, que no caso de *Quercus suber* caracteriza-se por uma amarelecimento da copa que pode ser generalizado ou localizado numa ou em poucas ramadas. Num estudo recente, RAGAZZI *et al.* (2002), atribuíram a principal causa de declínio das florestas de sobreiros em Itália, à seca. Os montados do interior Alentejano estão adaptados aos verões longos, quentes e secos e a grande irregularidade intra-anual na disponibilidade hídrica, sendo

previsível, no futuro uma maior frequência de anos secos e uma maior duração do período seco em Portugal (DAVID, 2005). Este facto, associado à degradação dos solos e à crescente utilização dos recursos hídricos locais, poderá contribuir para o aumento de mortalidade das árvores dominantes no montado (DAVID, 2005). A seca pode bem ser colocada a par dos diferentes ataques por agentes patogénicos. Enfraquecida pelas condições de seca, muitas vezes, a árvore não consegue vencer na luta contra os ataques por agentes patogénicos (WARGO, 1996).

Num estudo de JUNG *et al.* (2001), onde eram simuladas condições de seca e a acção simultânea de várias espécies de *Phytophthora* (*P. cinnamomi*, *P. quercina*, *P. cambivora*, *P. citricola* e *P. syringae* aff.), concluíram que a condição radicular do carvalho era significativamente mais influenciada pela infecção de *Phytophthora* do que pelo stress de seca por si só. Verificaram ainda que as espécies de *Phytophthora* eram capazes de sobreviver, produzir lesões nos sistemas radiculares sob condições de repetido stress hídrico e que os danos no sistema radicular causados por *P. cinnamomi* e *P. quercina* tendiam a ser mais severos quando em interacção com a seca (JUNG *et al.*, 2001).

Em 1996, BRASIER analisou, do ponto de vista teórico, a possibilidade da influência do aquecimento global na actividade de *P. cinnamomi*. O aumento da temperatura, em termos absolutos, terá sobretudo um maior impacto no aumento da dispersão deste agente patogénico, bem como, de algumas outras espécies deste género. Possivelmente, em consequência do aumento das temperaturas médias no Hemisfério Norte, algumas espécies do género *Phytophthora* (sobretudo *P. quercina*, mas também *P. cactorum* e *P. cambivora*) conseguiram invadir regiões tão a norte como as latitudes entre 54 e 58° N (JÖNSSON *et al.*, 2003). Em 2003, JÖNSSON *et al.*, apresentaram o primeiro registo de espécies de *Phytophthora* de ocorrência no solo, associadas a áreas de declínio de floresta de Quercíneas no sudeste da Suécia Continental e na ilha de Öland.

Segundo MACHADO (2005) os factores resultantes da intervenção humana directa no montado (descortiçamento acentuado, podas exageradas, abertura e destruição do sub-bosque) têm sido frequentemente referidos como associados ao declínio. Assim, os picos de calor e de frio após o descortiçamento, mesmo quando bem processado, podem levar à desidratação das camadas que vão dar origem à cortiça. O descortiçamento é, por si só, um processo que provoca um traumatismo, colocando grandes superfícies a nu. Este processo sujeita a árvore às variações climáticas, ao apodrecimento e aos ataques por agentes patogénicos. Sob condições climáticas extremas é mais prudente não proceder ao descortiçamento, pois, caso contrário, poder-se-á danificar irreversivelmente as árvores. São de desencorajar fortemente os dias de forte chuvada. Em alturas de tempo instável, muito quente ou muito ventoso não se deve proceder ao descortiçamento (MACHADO, 2005).

A floresta de *Quercus suber* é muitas vezes sujeita ao fogo, mas devido à espessa cortiça que compõe a casca do sobreiro, esta espécie, é considerada bastante resistente ao fogo

(BIANCO *et al.*, 2003 e PAUSAS, 1997). Segundo Naveh (1975) e Gill (1981) citados por PAUSAS (1997), muitas espécies mediterrâneas desenvolveram estratégias que lhes permitem sobreviver a fogos periódicos. Ainda segundo PAUSAS (1997), *Q. suber*, é a única árvore Europeia, com capacidade regenerativa acima do solo, após um incêndio. Esta característica deve-se à propriedade isoladora da cortiça, que, numa situação de incêndio, permite a protecção dos rebentos e do câmbio do tronco (PAUSAS, 1997). Estas características conferem ao sobreiro múltiplas vantagens económicas e ecológicas, tornando-a uma árvore excepcional. Na segunda metade do século XX a incidência de fogos na floresta mediterrânica aumentou como um resultado da actividade humana e da alteração climática global. A partir desta altura, os incêndios têm sido, sem dúvida, mais um factor que contribui para o declínio do montado. Esta acção destrutiva do fogo ocorre, particularmente, quando a cortiça ainda está pouco espessa ou quando o incêndio é muito intenso (devido à acumulação de vegetação arbustiva e de despojos da exploração florestal). Os resultados de um estudo de PAUSAS (1997), com o objectivo de descrever o efeito e a recuperação de *Q. suber* após um incêndio, sugeriram que: a mortalidade desta espécie após o fogo é extremamente reduzida; a morte dos troncos estava negativamente relacionada com o tamanho da árvore e a recuperação positivamente relacionada; as árvores de copa maior reagem melhor a um fogo que as de copa menor; a espessura da cortiça apresentava uma relação positiva com a capacidade de recuperação, o que sugere que o descortiçamento pode reduzir a capacidade das árvores recuperarem de um fogo. Finalmente este autor concluiu que *Quercus suber* é, provavelmente, uma das árvores melhores adaptadas ao fogo, devido à baixa mortalidade e à sua capacidade de regenerar e recuperar, o que a faz eleger como uma boa candidata a programas de reforestação de áreas frequentemente sujeitas a fogos (PAUSAS, 1997).

1.3. *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* RANDS

1.3.1. Introdução a *Phytophthora*

Segundo Dick (1985) (citado por ERWIN e RIBEIRO, 1996), o agente patogénico envolvido neste trabalho é um Biota do Domínio Eukaryota, pertencente ao reino CHROMISTA de Cavalier-Smith (1981), no qual estão agrupados os Filos Bacillariophyta (Diatomáceas), Chrysophyta (algas douradas), Oomycota (bolores aquáticos), Phaeophyta (algas castanhas), Haptophyta (Coccolitófora e outros), Sagenista (Bioceca, recentemente descrito, e Labyrinthulomycota), Silicoflagellata (Silicoflagelados) e Xanthophyta (algas amarelo-verdes). A espécie *Phytophthora cinnamomi* pertence ao Filo Oomycota, Classe Oomycetes, Subclasse

Peronosporomycetidae, Ordem Pythiales, Família Pythiaceae e Género *Phytophthora* (ERWIN e RIBEIRO, 1996). Recentemente foi proposta a designação de STRAMENOPIILA como reino, monofilético, candidato a incluir os Oomycetes, dadas as características encontradas nos estudos moleculares (ver Anexo I). Neste reino estariam incluídos os Filos Bacillariophyta (diatomáceas), Chrysophyta (algas douradas), Phaeophyta (algas castanhas) e Oomycota (bolores aquáticos, bolores terrestres e bolores parasitas) (ALEXOPOULOS *et al.* 1996; BLACKWELL e POWELL, 2000) (ver Anexo I).

Os Oomicetas (Filo Oomycota) possuem um certo número de qualidades biológicas que os distinguem dos outros microrganismos eucarióticos. Por exemplo, a parede celular é sobretudo composta por polímeros de β -1,3-glicano e celulose, contrariamente às paredes celulares fúngica, estas contêm pouca quitina (ERWIN *et al.*, 1983; ERWIN e RIBEIRO, 1996). Outras qualidades singulares incluem o glícido de reserva energética, micolaminarina (um β -1,3-glicano que também foi encontrado nas diatomáceas e nas algas castanhas), a diploidia no ciclo vegetativo, e os ciclos de vida, de infecção e ciclo sexual complexos (ERWIN *et al.*, 1983; ERWIN e RIBEIRO, 1996). Dentro dos Oomicetas, *Phytophthora* spp. são auxotróficos tanto para os esteróis como para a tiamina, e, caracteristicamente, requerem fontes exógenas de β -hidróxi-esteróis para a esporulação e da tiamina para o crescimento (ERWIN e RIBEIRO, 1996).

O género *Phytophthora* (do grego *phyto*=planta e *phthora*=destruidor) foi descrito pela primeira vez em 1876 por Anton de Bary como agente causador do míldio da batateira (ZENTMYER, 1983). As suas pesquisas acerca da doença que ameaçava na altura a agricultura e a economia mundial culminaram, então, na descrição do novo género *Phytophthora* e mais tarde, em 1866, na publicação do seu livro *Morphologie und Physiologie der Pilze*, onde descrevia vários aspectos da fisiologia do fungo (RIBEIRO, 1983).

Em 1983, ZENTMYER descreveu *Phytophthora* como causador de uma gama variada de doenças num certo número de plantas, que incluem cereais, espécies florestais, árvores de fruto subtropicais e tropicais, cerejeiras, noqueiras, muitas plantas ornamentais e cereais tropicais de valor económico acrescido (ZENTMYER, 1983).

ZENTMYER (1983) define as espécies de *Phytophthora* como tendo um certo número de características únicas distintivas de muitos outros fungos patogénicos como sejam: zoósporos móveis; esporângios formados sucessivamente ao fim de cada ramificação; caducidade ou não caducidade dos esporângios; parede celular composta por glicano (β -1,3 e β -1,6) e alguma celulose, em vez de quitina; existem espécies homotáticas e heterotáticas; cada oogónio forma um único oósporo; os anterídeos são geralmente únicos e podem ser paragíneos ou anfigíneos; possuem um ciclo de vida diplóide, com a meiose a ocorrer nos gametângios. Além destas características, ZENTMYER (1983), descreve ainda como únicas as respostas fisiológicas de acumularem apenas polissacarídeos (micolaminose) e de reagirem de forma diferente aos esteróides quando comparados com a maioria dos fungos superiores. São incapazes de

sintetizarem esteróides para a esporulação (HENDRIX, 1964) e são tolerantes aos antibióticos de polieno (ZENTMYER, 1983). A maior parte do ciclo de vida é diplóide enquanto que nos fungos superiores é haplóide (ERWIN e RIBEIRO, 1996).

Segundo SINGLETON *et al.* (1992), as características comuns das espécies de *Phytophthora* são: hifas asseptadas com ligeiras constrições nas bases; esporângios ovóides, obpiriformes ou até limoniformes e; a diferenciação de zoósporos biflagelados ocorre no esporângio. Os zoósporos são desprovidos de parede celular e os flagelos são heterocontes. O oogónio é globoso com uma só oósfere esférica, com periplasma fino ou ausente (SINGLETON *et al.*, 1992).

São os zoósporos os responsáveis pela disseminação da doença e pela infecção dos hospedeiros. No género *Phytophthora*, os zoósporos possuem geotaxia negativa, o que lhes permite permanecerem perto da superfície do solo onde as radículas são mais abundantes do que a maior profundidade (CARLILE e WATKINSON, 1994). Segundo Cameron e Carlile (1977) citados por GREGORY (1983), os zoósporos deslocam-se em direcção às plantas através de uma resposta quimiotáctica (quimiotaxia positiva, ou seja, são atraídos especificamente para as raízes das plantas), quando entram em contacto com a superfície da raiz enquistam, perdendo os flagelos e desenvolvem uma parede espessa. Após o enquistamento, o quisto germina, emerge um tubo germinativo com um apressório, que surge para penetrar a camada de células epidérmicas, e ocorre uma tentativa de infecção (RIBEIRO, 1983; IRWIN *et al.*, 1995). A mobilidade dos zoósporos e o movimento específico em direcção aos seus hospedeiros fazem dos fungos pertencentes ao género *Phytophthora*, particularmente poderosos, no que respeita à capacidade de dispersão geográfica.

Segundo HOHL (1991) a adesão representa um papel importante na acção patogénica. A adesão pode envolver a superfície dos esporos ou quistos, hifas ou tubos de germinação ou outros órgãos de ligação. Para que a ligação à superfície do hospedeiro ocorra, os fungos, geralmente, produzem um material adesivo. O interesse no fenómeno da adesão é devido ao contacto entre o hospedeiro e o parasita poder conduzir a mais aperfeiçoadas interacções, que não à simples "colagem", entre as moléculas superficiais como o reconhecimento e a indução de acontecimentos relacionados com a patogénese (HOHL, 1991).

1.3.2. Descrição da Espécie

Phytophthora cinnamomi é um agente patogénico, de ocorrência no solo, extremamente virulento com uma grande gama de hospedeiros. Foi descrito pela primeira vez por Rands (1922) nas plantas da canela (*Cinnamomum burmannii* Blume), na Sumatra (ERWIN e RIBEIRO, 1996). Presentemente, a lista de hospedeiros relativa a esta espécie é superior a 1000 espécies de

plantas (ERWIN e RIBEIRO, 1996). Uma parte considerável das espécies hospedeiras são plantas lenhosas (SMITH *et al.*, 1988; ZENTMYER, 1983, 1994). Este fungo infecta, geralmente, plantas nos períodos juvenis, matando de forma indiferenciada plantas juvenis ou adultas (ERWIN e RIBEIRO, 1996). As doenças provocadas por *P. cinnamomi* são especialmente difíceis de controlar por aplicação de métodos biológicos (isoladamente ou simultaneamente, com técnicas de cultura), por um lado, dada a vasta gama de hospedeiros e, por outro, pelo carácter adaptativo do ciclo de vida do agente patogénico (FINLAY e McCRAKEN, 1991). Durante a maior parte do ciclo de vida, este organismo, encontra-se no estado de micélio vegetativo e quando as condições do meio ambiente se tornam limitantes (carência de nutrientes ou outros factores) induz a esporulação, com consequente produção de zoósporos (HARDHAM *et al.*, 1994).

Os sintomas da doença incluem numa primeira fase infecção das raízes secundárias de pequenas dimensões, pouco a pouco, a infecção propaga-se até às raízes de maiores dimensões, e, então, as raízes infectadas apodrecem (ZENTMYER, 1983). Numa segunda fase ocorre redução do tamanho das folhas, descoloração das folhas, aparecimento de um colar negro em torno da base do caule ou do troco, apodrecimento do caule ou tronco e, por último, a morte da planta infectada (ZENTMYER, 1983).

Phytophthora cinnamomi pode ser disseminado pela água de escorrência, por plantas infectadas transportadas para outros locais, ou por equipamento agrícola usado para arar o solo (ZENTMYER, 1977). Vários investigadores apontam uma forte ligação entre a dispersão do fungo e as actividades humanas que impliquem utilização dos solos e das raízes (introdução de plantas exóticas, movimentação dos solos de um local para outro, compressão dos solos, fertilização, lavra, etc.) (ZENTMYER, 1983; ZENTMYER, 1988; CABRAL e SARDINHA, 1992; BERNARDO *et al.*, 1992; BARROS *et al.*, 2002). O alto teor de humidade do solo e temperaturas elevadas, estão entre os factores mais importantes, pois que, favorecem a esporulação, o crescimento do fungo e aumentam a susceptibilidade do hospedeiro (RIBEIRO, 1983).

Este fungo desenvolve-se de preferência em solos sujeitos a intensa pluviosidade ou irrigação excessiva e temperaturas na ordem dos 20 a 27° C (ERWIN e RIBEIRO, 1996).

1.3.3. Características de *Phytophthora cinnamomi*

Morfologicamente, *Phytophthora cinnamomi* é caracterizado por ser produtor de esporângios não papilados (comprimento x largura médios, 75 x 40 µm), oogónios e oósporos globosos (diâmetros médios, 40 e 20 µm, respectivamente), anterídeos (comprimento x largura médios, 19 x 17 µm), clamidósporos globosos (diâmetro médio, 41 µm), esporângios ovóides a elipsóides não papilados [comprimento e largura médios de 75x40 µm (HO e ZENTMYER, 1977)] e hifas (diâmetro 5 a 8 µm) despigmentadas, contendo numerosas protuberâncias globosas que dão um

aspecto coraliforme ao micélio cenocítico (ERWIN e RIBEIRO, 1996). É uma das espécies mais facilmente identificáveis de entre o género *Phytophthora* (HO e ZENTMYER, 1977). É uma espécie heterotática, isto é, formam-se oósporos quando o tipo de acasalamento A1 entra em contacto com o tipo A2 (ZENTMYER, 1976; ZENTMYER *et al.*, 1983), sendo este último o mais vastamente distribuído (OLD *et al.*, 1984)

Em termos de crescimento este fungo apresenta uma temperatura óptima entre 24 e 28° C, mínima entre 5 e 6° C e máxima entre 32 e 34° C (ERWIN e RIBEIRO, 1996).

1.3.4.Ciclo de Vida de *Phytophthora cinnamomi*

Alguns autores (Dick, 1987 citado por ERWIN e RIBEIRO, 1996) recomendam a utilização da designação história de vida em detrimento de ciclo de vida.

Nas fases assexuadas (diplóides) da história de vida dos tipos de acasalamento A1 e A2, quando as condições ambientais, são de temperatura elevada e humidade, os filamentos miceliais (ou hifas) que formam o talo do fungo no solo ou no tecido vegetal hospedeiro produzem vegetativamente sacos de esporos microscópicos denominados esporângios e clamidósporos de parede espessa (ERWIN e RIBEIRO, 1996).

Os clamidósporos são esporos de maiores dimensões do que os zoósporos, possuem parede espessa (embora não tão espessa como o oósporo) e têm uma maior duração de vida. Os clamidósporos constituem a fase de resistência e de “dormência” do fungo, em condições de seca, podem estar presentes no interior das plantas infectadas ou mortas e no solo (ERWIN e RIBEIRO, 1996). Podem ser transportados em fragmentos radiculares ou no solo e em seguida germinarem para causarem uma nova infecção quando encontrarem condições de calor e de humidade óptimas. Os clamidósporos germinados podem produzir esporângios, mais clamidósporos, ou micélio, que, por sua vez, pode infectar, directamente, as raízes (ERWIN e RIBEIRO, 1996).

Os esporângios produzem cerca de 30 zoósporos (esporos biflagelados) com capacidade para nadarem, durante um curto período de tempo (poucas horas), percorrendo distâncias muito curtas (25-35 mm) em águas estagnadas ou em filmes de água nos poros do solo ou podem ser transportados por água em movimento por distâncias mais longas (ERWIN e RIBEIRO, 1996).

Devido às propriedades tácteis dos zoósporos (geotaxia negativa e quimiotaxia positiva relativamente às raízes das plantas) são atraídos em direcção aos ápices radiculares das plantas, onde aderem, enquistam, e emitem tubos germinativos que penetram as células epidérmicas das raízes (ERWIN e RIBEIRO, 1996). Apesar dos zoósporos terem vidas curtas e terem uma natureza frágil, como são produzidos em grandes quantidades, provavelmente, são a causa da maioria das infecções em novas localizações geográficas (ERWIN e RIBEIRO, 1996).

O micélio cresce, então, no interior da raiz das plantas susceptíveis e pode crescer de planta em planta via pontos de contacto entre raízes (este crescimento é a causa principal de dispersão de uma infestação crescente por *P. cinnamomi*) (ERWIN e RIBEIRO, 1996).

Na fase sexuada, os micélios dos dois tipos de acasalamento (A1 e A2) podem crescer conjuntamente, entrelaçando-se entre si e produzindo anterídeos e oogónios (HO e ZENTMEYER, 1977). O anterídeo produz um tubo de fertilização que penetra o oogónio, como resultado são formados esporos sexuais globosos de parede espessa denominados oósporos (HO e ZENTMEYER, 1977).

Após a infecção o micélio cresce ao longo do tecido da raiz causando colapso celular e decaimento do tecido (ERWIN e RIBEIRO, 1996). O agente patogénico expande-se pelas raízes principais das espécies susceptíveis e pode formar uma faixa à volta da base do tronco (ERWIN e RIBEIRO, 1996). A morte da planta ocorre porque o transporte de água das raízes é interrompido (ERWIN e RIBEIRO, 1996). Vários factores ambientais controlam o grau de crescimento do micélio no interior da raiz. Por exemplo, há pouco crescimento quando o conteúdo hídrico do tecido vegetal é inferior a 80 % (ERWIN e RIBEIRO, 1996). Nas espécies susceptíveis, a morte pode ocorrer em semanas, enquanto que nas espécies moderadamente susceptíveis a árvore pode morrer num prazo de um ano ou mais ou pode mesmo não chegar a morrer após a infecção (ERWIN e RIBEIRO, 1996). As espécies susceptíveis e moderadamente susceptíveis têm a capacidade de travar a infecção de modo a prevenir a multiplicação adicional do micélio, com vários graus de sucesso (ERWIN e RIBEIRO, 1996).

1.3.5. Distribuição da Espécie

1.3.5.1. No Globo

ZENTMYER (1983, 1988) descreve *Phytophthora cinnamomi* com uma vasta distribuição geográfica, comportando-se em muitas plantas hospedeiras como agente patogénico primário que ataca as raízes. Ainda, segundo este autor, este agente patogénico provoca lesões severas em centenas de espécies de plantas em regiões temperadas moderadas, subtropicais e tropicais (ZENTMYER, 1983). Há referências de ocorrência deste agente patogénico em todos os continentes: América do Norte (MIRCETICH e MATHERON, 1976; MIRCETICH *et al.*, 1977); América do Sul (ZENTMYER, 1988); Europa (ROBIN, 1992; ROBIN *et al.*, 1992a e 1992b; ROBIN *et al.*, 1994; ROBIN *et al.*, 1998); Ásia; África (Von Broembsen 1979 citado por ZENTMYER, 1988); Austrália (WESTE *et al.*, 1973; WESTE, 1974; WESTE e RUPPIN, 1975; WESTE e RUPPIN, 1977; WESTE e MARKS, 1987; DUDZINSKI *et al.*, 1993; KINAL *et al.*, 1993; WILLS,

1993; WESTE e ASHTON, 1994; WILLS e KEIGHERY, 1994; WILLS e ROBINSON, 1994; HILL *et al.*, 1994; SHEARER, 1994; HILL *et al.*, 1995; EL-TARABILY *et al.*, 1996; SHEARER e DILLON, 1996; HÜBERLI *et al.*, 2001). Na Fig. 1-2 apresenta-se a distribuição de *Phytophthora cinnamomi* no globo, numa adaptação de CMI (1991). ZENTMYER, em 1988, num artigo intitulado “Origin and Distribution of Four Species of *Phytophthora*”, descreve a vasta distribuição de *P. cinnamomi* no planeta e adianta possíveis origens deste agente patogénico. A dispersão desta espécie deve-se, provavelmente, a acção humana (ERWIN e RIBEIRO, 1996). Com efeito, o Homem, nos últimos 500 anos, dedicou-se à introdução de plantas em novas áreas do planeta e com elas foram trazidos agentes patogénicos, nomeadamente, *P. cinnamomi* que é um fungo de ocorrência no solo, onde estas plantas teriam sido transportadas (ZENTMYER, 1988).

Em 1996, JUNG *et al.*, descreviam os sintomas gerais característicos do declínio da floresta europeia que vinham preocupando os produtores florestais e silvicultores desde os anos 70. Ainda neste artigo estes autores adiantavam a hipótese do excesso de azoto no solo e a ocorrência frequente de Invernos e Primaveras pouco húmidos poderem contribuir para o declínio da floresta (JUNG *et al.*, 1996).

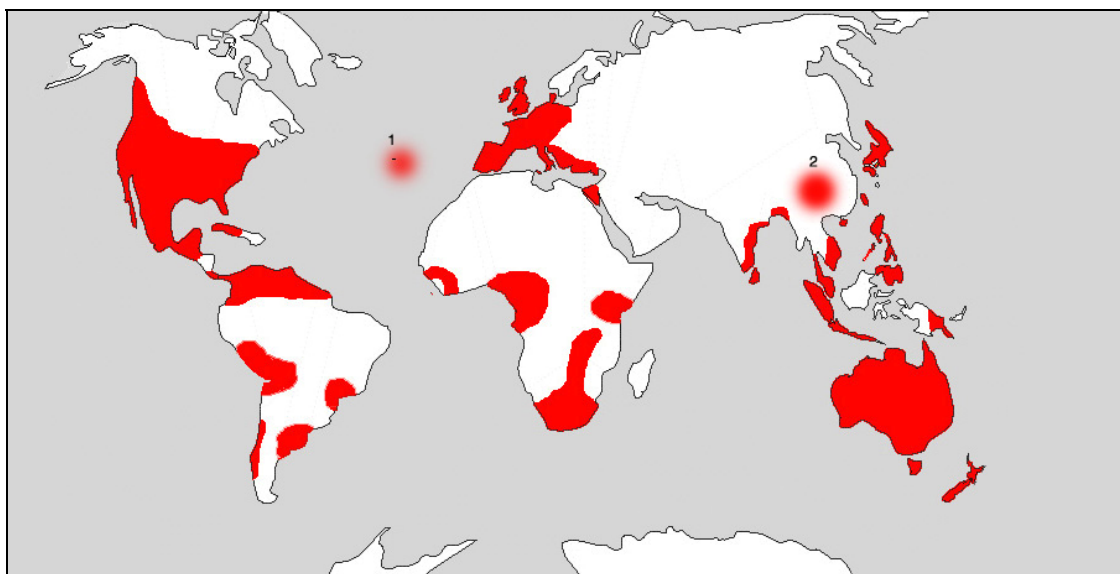


Fig. 1-2: Distribuição de *Phytophthora cinnamomi* no globo.
As zonas 1 e 2 são zonas onde o fungo foi isolado mais recentemente. [Adaptado de CMI (1991)].

De uma forma geral, as Quercíneas são consideradas mais resistentes a este fungo do que as outras espécies de Fagaceae (MONIZ *et al.*, 1996). Considera-se que o estado nutricional da planta hospedeira seja, também, um factor de resistência à doença (HOHL, 1983).

1.3.5.2. América

Phytophthora cinnamomi chegou à América do Norte provavelmente à 200 ou mais anos e espalhou-se silenciosamente, mas com efeitos letais ao longo do Sudeste dos Estados Unidos (HANSEN, 2003). Em 1824 surgiram os primeiros relatos de mortalidade súbita e sem precedentes do castanheiro americano (HANSEN, 2003).

Em 1945, Crandall *et al.* (citados por BRASIER, 1996) referiram que no início do século XX, ocorreu uma epidemia, provocada por *Phytophthora cinnamomi*, em castanheiros e *Q. muehlenbergii*.

Em 1977, MIRCETICH *et al.* relataram o aparecimento de cancos do tronco em *Q. agrifolium* e *Q. suber* no estado da Califórnia.

Nos Estados Unidos as espécies mais afectadas por este agente etiológico são *Castanea dentata*, *Pinus echinata*, *Pinus radiata* e várias espécies de Quercíneas (HANSEN, 2003).

No arquipélago do Havai, este fungo foi, presumivelmente, introduzido pelos primeiros colonos e actualmente está implicado no declínio de *Metrosideros colina* (HANSEN, 2003).

No México a história de invasão por este agente repetiu-se, em 1987, no estado de Colima, afectando uma área de várias centenas de hectares à volta de uma comunidade rural e matando várias espécies de Quercíneas nativas e plantas susceptíveis (TAINTER *et al.*, 2000 e HANSEN, 2003).

1.3.5.3. Europa

Estima-se que *P. cinnamomi* foi introduzido na Europa no início do século XIX e tornou-se vastamente distribuído por volta dos anos 40 do século XX, quando surgiu uma epidemia maciça no castanheiro (BRASIER, 1996). Por toda a Europa, durante o século XX, foram também surgindo relatos que apontavam o Oomiceta, *Phytophthora cinnamomi*, como um dos factores que contribuíam para o declínio de várias Fagaceae (MIRCETICH *et al.*, 1977; ROBIN *et al.*, 1992a e 1992b; BRASIER, 1992a e 1992b; BRASIER *et al.*, 1993; BRASIER e SCOTT, 1994; BLASCHKE, 1994, JUNG e BLASCHKE, 1995a e 1995b). Contudo, os estudos que relacionam doenças em géneros da família Fagaceae com *P. cinnamomi*, como sejam, o aparecimento de exsudações de cor negra, remontam a algumas décadas. Exemplos destes estudos são os de Rol, em 1951, de Bariety *et al.*, no mesmo ano e de Moreau e Moreau, em 1952 (citados por ROBIN *et al.*, 1992a e 1992b).

ROBIN *et al.* (1992b), descreveram *P. cinnamomi*, como sendo o agente patogénico causador da doença da tinta em *Quercus rubra*, indutor de sintomas como cancrios corticais, necroses no câmbio, necroses no floema e cicatrizes nos tecidos xilémicos. Ainda segundo estes autores, *P. cinnamomi* pode persistir na raiz das árvores por vários anos, sem que apareçam sintomas na parte aérea. A evolução da doença faz-se de baixo para cima, e o fungo possui uma actividade sazonal, ocorrendo preferencialmente durante o início da Primavera (Robin *et al.*, 1992b). As lesões começam a manifestar-se na raiz e vão progredindo em direcção ao topo do tronco. Segundo Bariety *et al.* (1951) (citados por ROBIN *et al.*, 1992b), o agente patogénico coloniza os tecidos corticais e, localmente, mata o câmbio. O apodrecimento da raiz é um sintoma comum nas raízes de absorção, nas raízes vigorosas ou em ambas. Os zoósporos acumulam-se preferencialmente na região de alongamento, imediatamente após o término da raiz (BRASIER, 1992c). A infecção iniciada ao nível do solo prossegue em altura, sendo o sintoma mais notável o aparecimento de necroses (IRWIN *et al.*, 1995). Os sintomas tardios consistem no apodrecimento da parte aérea da planta (IRWIN *et al.*, 1995).

Nos anos 80, o declínio dos sobreiros, em vários países mediterrâneos, foi atribuído a este agente patogénico (BRASIER *et al.*, 1993). ROBIN *et al.* (1998) detectaram vários casos que envolviam o fungo *Phytophthora cinnamomi* e a doença ou morte de sobreiros em França.

Os resultados de um Projecto de Pesquisa da União Europeia mostraram que, em inspecções florestais de carácter intensivo, foram detectadas, no solo das florestas Europeias, muitas espécies de *Phytophthora*: *P. quercina* (41% de 58 locais positivos); *P. citricola* (38%); *P. cinnamomi* (17%); *P. gonapodyides* (16%); *P. cambivora* (16%); *P. europaea* (14%); *P. syringae* (14%); *P. megasperma* (10%); *P. cactorum* (7%); *P. psychrophylla* (2%) e; *P. cryptogea* (2%) (DELATOUR *et al.*, 2001).

1.3.5.4. Península Ibérica

Na Península Ibérica alguns registos da doença e do isolamento do agente patogénico *Phytophthora cinnamomi* surgiram associados ao castanheiro (*Castanea sativa*) (SILVA TAVARES, 1927; BRASIER, 2003).

Num estudo intitulado “Distribution of the isolations of *Phytophthora cinnamomi* in the Spanish *Quercus* areas with oak decline disease”, TUSET *et al.* (2002), relataram o isolamento de *P. cinnamomi* em 40 amostras de um total de 536, obtidas em 10 províncias da região ocidental de Espanha.

Em 1991, BRASIER *et al.* (1993), conseguiram isolar *Phytophthora cinnamomi* a partir de raízes de sobreiros doentes na Península Ibérica (Fig. 1-2).

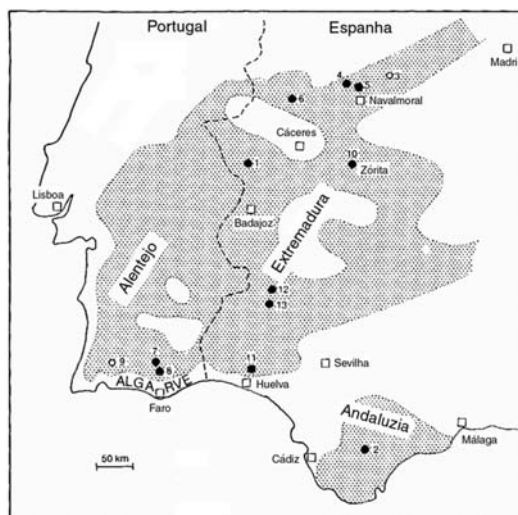


Fig. 1-3: Distribuição de locais de doença amostrados para *Phytophthora cinnamomi* em Espanha e Portugal.

Área sombreada, região de predominância de *Quercus suber* e *Q. ilex*; ● Isolamento de *P. cinnamomi*; ○ *P. cinnamomi* não isolado. Nos locais 7 (Cortelha) e 8 (Bicas da Serra) foi isolado o fungo a partir de raízes (8) e raízes finas (7) de solos da base dos vales. Nestes dois locais também foram isoladas outras espécies de *Phytophthora* (incluído *P. gonapodyides*, *P. dreschleri* e *P. megasperma*) a partir de solo húmido. [Adaptado de BRASIER *et al.* (1993)].

BRITO DE CARVALHO (1993) descreveu a história da doença em Portugal, que está resumida na Tabela 1-2.

Em Portugal, os registos da doença remontam a 1898, num trabalho publicado por Veríssimo de Almeida. Este autor apresentou o primeiro relato de uma doença que atacava indiscriminadamente árvores adultas e jovens, conduzindo-as a uma morte prematura.

SILVA TAVARES (1927), A. LOPES PIMENTEL (1945, 1946, 1949), BAETA NEVES (1948, 1949, 1954) e VIEIRA NATIVIDADE (1990), encontram-se entre os distintíssimos investigadores portugueses que, durante o século XX, se referiram à doença que afectava o sobreiro.

SILVA TAVARES (1927) refere-se à doença dos sobreiros, relacionando-a, empiricamente, com a doença do castanheiro (*Castanea sativa*).

Em 1946, PIMENTEL, conseguiu isolar, do vértice vegetativo das necroses observadas em castanheiro, dois Fomicetas, de características bastante diferentes. A estirpe mais virulenta foi também isolada de *Quercus suber* (PIMENTEL, 1946). Descreveu ainda a morte de um grande número de sobreiros, que na maioria tinham sido recentemente descortiçados e identificou os agentes causais como sendo duas estirpes de *Phytophthora cambivora*.

Tabela 1-2: Breve história da doença dos sobreiros em Portugal.
[Adaptado de BRITO DE CARVALHO (1993)]

Ano	Referência	Observações
1898	Veríssimo de Almeida (1898). Acerca dos montados de sobreiro. <i>A Agricultura Contemporânea</i> , Tomo VIII, nº 10: 375-381.	Aparecimento de uma doença que atacava tanto árvores adultas como jovens, conduzindo-as a uma morte prematura.
1927	Silva Tavares (1927). A doença dos castanheiros. <i>Brotéria</i> , número especial sobre agricultura na festiva comemoração do vigésimo aniversário da Brotéria: 15-17.	Referência à doença, relacionando-a, empiricamente, com a doença do castanheiro (<i>Castanea sativa</i>).
1944	A. Lopes Pimentel (1946). O sobreiro também parasitado pela <i>Phytophthora cambivora</i> (Petri) Buis., agente da "doença da tinta" do castanheiro. <i>Publ. Dir. Ger. Serv. Flor. e Aquic.</i> , 13: 45-49.	Isolamento no vértice vegetativo das necroses verificadas em castanheiro de dois Ficomietas, de características bastante diferentes. A estirpe mais virulenta foi também isolada de <i>Quercus suber</i> .
1946	A. Lopes Pimentel (1946). O sobreiro também parasitado pela <i>Phytophthora cambivora</i> (Petri) Buis., agente da "doença da tinta" do castanheiro. <i>Publ. Dir. Ger. Serv. Flor. e Aquic.</i> , 13: 45-49.	Descrição da morte de um grande número de sobreiros, na maioria recentemente descortçados; Identificação dos agentes causais, anteriormente isolados, como duas estirpes de <i>Phytophthora cambivora</i> .
1949	A. Lopes Pimentel (1953). Uma ameaça para os montados nacionais. <i>Estudos e informação</i> , 11 (c3): 1-9.	Rectificação da nomenclatura de um dos fungos isolados (o mais virulento) em 1944, designando-o como <i>P. cinnamomi</i> .
Décadas de 40-50	Baeta Neves, C.M. (1948). A "Investigação Científica" e os Problemas da "Protecção" do Sobreiro. <i>Bul. J.N.C. X</i> , 116: 386-389. Junho. Baeta Neves, C.M. (1949). A Seca dos Sobreiros. <i>Gazeta das Aldeias</i> , 2168: 730-734. Outubro. Baeta Neves, C.M. (1954). A Morte dos Sobreiros no Vale do Tejo. <i>Gazeta das Aldeias</i> , 2284: 568-570. Agosto.	Referência à doença, pelo menos, por três vezes.
1950	Natividade, J.V. (1990). <i>Subercultura</i> . Imprensa Nacional Casa-da-Moeda (2ª Edição Fac-Similada da 1ª Edição de 1950).	Referência à doença que afectava o sobreiro. Desde então, não se verificou qualquer outra referência até à década de oitenta.

Em 1953, a rectificação feita por A. Lopes Pimentel explica-se facilmente, pois nos anos quarenta, estas duas espécies eram confundidas na literatura científica europeia (BRASIER, 1992c). Em 1944, Pimentel, conseguiu isolar, a partir de castanheiro, dois fungos parasitas, de morfologia, biologia e grau de patogenicidade bastante diferentes, concluindo que se tratavam de duas estirpes de *P. cambivora* (PIMENTEL, 1946). Uma das estirpes, a mais virulenta e mais frequente, foi posteriormente isolada de *Quercus suber*, em Alpiarça (PIMENTEL, 1946). PIMENTEL, em 1949, apoiado nos estudos de Leonian (1925 e 1927), Leonian e Geer (1929) e Crandall, Gravatt e Ryan (1945), rectifica a nomenclatura dada a esta estirpe mais virulenta, confirmando, em absoluto, a afinidade das características entre o isolado e uma outra cultura pura de *P. cinnamomi* (PIMENTEL, 1949).

Mais recentemente, BRASIER *et al.* (1993), conseguiram isolar *P. cinnamomi* a partir de raízes de sobreiros doentes, confirmando a hipótese, intuitivamente, levantada por Silva Tavares e mais tarde, cientificamente, proposta por Pimentel em 1949.

Nas últimas décadas, em Portugal, esta matéria tem sido estudada pelas principais instituições de investigação na área florestal e a título de exemplo referem-se os estudos de

GOUVEIA (1993), MONIZ *et al.* (1996), Ferraz (desde 1993), SEABRA e PAIS (1993 e 1999) e MOREIRA (2002).

MOREIRA (2002), referiu que, num estudo de levantamento feito entre 1994 e 1998, foi possível isolar *Phytophthora cinnamomi* em 56 estações de sobreiro e azinheira localizadas em quatro regiões de Portugal (Trás-os-Montes, Ribatejo, Alentejo e Algarve) e enfatizava a vasta dispersão deste fungo nos solos portugueses, particularmente no Algarve, onde o declínio provocado pela doença apresenta uma alta incidência.

MIRCETICH *et al.* (1977) descreveram os sintomas desta doença em sobreiros: as árvores começam a mostrar um crescimento deficiente, clorose das folhas e copa escassa, em todas as fases da doença; aparecimento de cancrios na base dos troncos que vão progredindo até ao topo do tronco. O sobreiro apresenta cancrios no tronco que podem não ser evidentes nas árvores maiores por causa da casca suberosa da árvore ser normalmente profundamente fendida. A exsudação dos cancrios é, geralmente, negra. Os sobreiros jovens evoluem para declínio em poucos anos até que os troncos sejam completamente cercados ou o apodrecimento da raiz seja severo (MIRCETICH *et al.*, 1977).

1.3.6. Controlo e Detecção

São inúmeras as referências bibliográficas que indicam formas de controlo biológico ou químico para as espécies de *P. cinnamomi*. As obras de ERWIN *et al.* (1983) e de ERWIN e RIBEIRO (1996) intituladas “*Phytophthora* research. In: *Phytophthora – Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*” e “*Phytophthora. Diseases Worldwide*”, respectivamente, sintetizam os contributos de inúmeros autores relativamente a estas temáticas.

Entre as medidas de controlo preconizadas encontram-se: o controlo do potencial de matriz do solo; a utilização de solos supressivos (solos lateríticos), para novas plantações; a selecção de locais livres do agente infeccioso e; as remediações orgânicas (culturas para sideração ou adubo verde de luzerna ou cevada, utilização de estrume de galinha ou ureia) ou químicas (superfosfato, enxofre elementar, carbonato de cálcio, nitrato de cálcio, amónia, fertilizantes de amoníaco ou nitrato) dos solos (ERWIN e RIBEIRO, 1996). O controlo biológico por aplicação de agentes antagonistas para o género *Phytophthora* é matéria controversa e baseia-se na capacidade de um agente microbiano ser eficaz na eliminação de um determinado agente patogénico pela sua actividade lítica sobre estruturas como o micélio, clamidósporos, esporângios e oósporos (ERWIN e RIBEIRO, 1996). A maioria destes antagonistas possuem um efeito demonstrável laboratorialmente, contudo a sua eficácia no campo é muito limitada (ERWIN e RIBEIRO, 1996). Para a espécie *P. cinnamomi* o controlo biológico pode ser promovido por diversas espécies de Basidiomicetas e de Hifomicetas (Monidiales), as quantidades de referências

bibliográficas relacionadas com o controlo biológico promovido por outros tipos de microrganismos (leveduras, bactérias ou protozoários) são, consideravelmente, menores (ERWIN e RIBEIRO, 1996).

Os fungicidas usados no controlo a *P. cinnamomi* estão incluídos nos biocidas irradiadores por supressão do *inoculum* e nos fungicidas sistémicos (ERWIN e RIBEIRO, 1996). Nos primeiros englobam-se os produtos de amónia quaternária (Superquat, Applied 3-300, Liquitrain e Chemene), os compostos mistos contendo cobre (Protiocarb, Tridiazole e Furalaxil) e o brometo de metilo e cloropicrina (ERWIN e RIBEIRO, 1996). Nos segundos, os fungicidas de fosfonato (Fosetil de alumínio ou ALUETTE® 80 PM), de fenilamida (metalaxil) e os carbamatos (Propamocarb) (ERWIN e RIBEIRO, 1996). Mais recentemente DANIEL *et al.* (2005) estudaram o efeito dos fosfitos no controlo de *P. cinnamomi*.

DRENTH e GUEST (2004) e GOZZO (2004) referem-se a uma nova geração de produtos de origem biológica com capacidade de induzirem resistência sistémica adquirida (SAR) que são objecto de grandes expectativas, sobretudo, por parte dos produtores agrícolas e florestais. Grande parte destes produtos activos ou ainda não estão disponíveis ou não estão autorizados (DRENTH e GUEST, 2004; GOZZO, 2004).

Até à data não foi encontrada uma forma de combate, universalmente aceite, relativamente a este agente patogénico.

A título de exemplo, enumeram-se algumas medidas de controlo preconizadas: desinfectar os utensílios (machados, serras, tesouras de poda) e as máquinas florestais, evitar a compactação do solo; quarentena de plantas exóticas; evitar o transporte se solo de um local para outro; evitar a lavra à volta das plantas florestais (DRENTH e GUEST, 2004). A quarentena e as boas práticas de higiene fitossanitária são medidas fundamentais utilizadas no controlo da dispersão deste agente infeccioso.

A detecção de *Phytophthora* em plantas doentes tem-se revestido de alguma dificuldade desde o início dos estudos desta patologia foram usadas técnicas de isolamento diferentes recorrendo à utilização de agentes antibacterianos, antimicóticos, antipitíacos, técnicas de engodo e mais recentemente começou a ser utilizada a técnica de ensaios imunológicos específicos. Esta última pode ser utilizada para o diagnóstico de espécimes vegetais que expressem apodrecimentos da raiz ou da coroa. Contudo, este ensaio pode dar reacção positiva com algumas espécies de *Pythium* e *Peronospora parasitica* que tornam a interpretação difícil. Os testes de diagnóstico por ensaio imunológico, quando combinados com o historial do campo e a sintomatologia, provaram ser muito úteis no diagnóstico de doenças relacionadas com as espécies de *Phytophthora* (PSCHEIDT *et al.*, 1990). PETERSON *et al.* (1990) descrevem o imuno-ensaio (ELISA), baseado numa mistura de dois anticorpos monoclonais desenvolvidos para detectar espécies de *Phytophthora* em tecidos vegetais, sublinhando o facto do ensaio no laboratório poder ser realizado em menos de uma hora e poder ser detectado o agente patogénico na raiz muito

antes de serem visíveis os sintomas acima do solo. Estes autores referem ainda a possibilidade de realização de um ensaio no local, com a mesma sensibilidade do ensaio no laboratório, que pode ser completado em menos de 10 min. (PETERSON *et al.*, 1990).

Na Fig. 1-4 apresenta-se um esquema de detecção e identificação de *Phytophthora cinnamomi*.

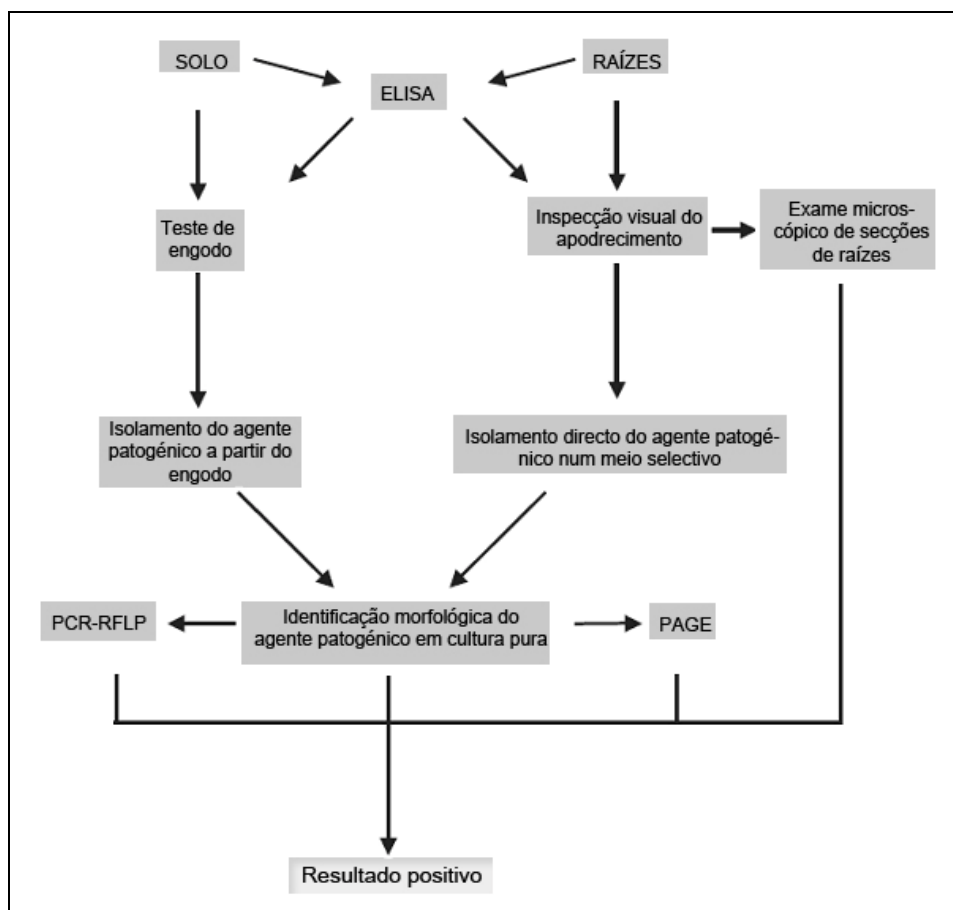


Fig. 1-4: Esquema de detecção e identificação de *Phytophthora cinnamomi*. [Adaptado de EMPPO/OEMPP (2004)].

Recentemente, numa publicação de 2004, a Organização Europeia e Mediterrânica de Protecção das Plantas (OEMPP), apresentou o protocolo de diagnóstico (no âmbito dos protocolos de diagnóstico para as espécies regulamentadas, aprovação e emenda ratificada em Setembro de 2003) específico para *Phytophthora cinnamomi* (EMPPO/OEMPP, 2004) que está resumido na Fig. 1-4.

Trata-se de um método de combinação de várias técnicas (ELISA, inspeção visual, exame microscópico, testes de engodo, isolamento, PAGE, PCR e RFLP) que denota a dificuldade de detecção e identificação deste agente patogénico.

1.3.7. Patogenicidade de *Phytophthora cinnamomi* em Relação a *Quercus suber*

A patogenicidade de *Phytophthora cinnamomi* relativamente a um determinado hospedeiro é uma característica relativamente estável (DUDZINSKI *et al.*, 1993). Contudo, sabe-se ocorrer um certo grau de variação tanto em termos de morfologia (da colónia, esporangial e gametangial) como de patogenicidade em vários isolados comprovadamente oriundos da mesma linha clonal (por análise de DNA de microssatélite) (HÜBERLI, 2001). Por esse motivo a variação da patogenicidade entre vários isolados, mesmo que procedentes da mesma região geográfica, é um factor a ter em conta nos estudos de resistência a este agente patogénico.

Em 1996, num estudo intitulado “Avaliação da Patogenicidade de *Phytophthora cinnamomi* Rands em Sobreiro (*Quercus suber* L.)”, MONIZ *et al.*, compararam vários isolados do fungo (Trás-os-Montes e Espanha), diferentes tipos de substratos, diferentes tipos de inoculação e diferentes idades da planta. Testaram a virulência dos isolados do fungo em plantas de castanheiro (muito susceptível, apresenta mortalidade 100% e re-isolamento positivo em todas as plantas) e de sobreiro. Para as plantas de sobreiro obtiveram mortalidade nula no final dos ensaios e re-isolamento negativo e não encontraram qualquer tipo de patogenicidade de *P. cinnamomi* (MONIZ *et al.*, 1996). Em conclusão, afirmaram que dentro das condições testadas, não encontraram qualquer tipo de patogenicidade para o sobreiro. Com efeito, os estudos de MIRCETICH *et al.* (1977) conduziram à conclusão que *Quercus suber* é mais resistente do que *Q. agrifolia*. Concluíram, ainda, que *P. cinnamomi* é mais virulento em plantas jovens do que em árvores adultas. ROBIN *et al.* (1992), descreveram *Q. rubra*, como uma espécie relativamente tolerante, já que consegue resistir à infecção sem morrer. Assim as Quercíneas, globalmente, são consideradas pouco susceptíveis a este fungo. Pensa-se que o estado nutricional da planta hospedeira seja, também, um factor de resistência à doença (HOHL, 1983).

BIANCO *et al.* (2001) testaram a patogenicidade de várias espécies de *Phytophthora* relativamente a várias Quercíneas inoculando germinadas na região da base e verificando o estado da infecção 3 meses após a inoculação, por análise do comprimento do escurecimento do caule e do re-isolamento do fungo. Estes testes indicaram que as espécies de *Phytophthora* (*P. cactorum*, *P. cambivora*, *P. cinnamomi*, *P. citricola*, *P. gonapodyides*, *P. quercina* e *Phytophthora* sp.) são diferentemente agressivas em relação às cinco espécies de *Quercus* (*Q. ilex*, *Q. frainetto*, *Q. pubescens*, *Q. cerris* e *Q. robur*). Com efeito *P. cambivora* e *P. cinnamomi* eram as mais patogénicas, *P. citricola* e *P. gonapodyides* eram moderadamente agressivas e *P. quercina* geralmente não era patogénica (BIANCO *et al.*, 2001). Igualmente as espécies Quercíneas mostraram divergência de susceptibilidade sendo *Q. ilex* a mais susceptível, seguida por *Q. robur*, enquanto as outras três espécies de *Quercus* não mostraram diferenças consideráveis entre elas (BIANCO *et al.*, 2001).

1.4. CONCLUSÃO

O Bosque Mediterrânico é um ecossistema que interessa preservar tanto do ponto de vista ambiental como do ponto de vista económico. O Montado é um ecossistema que resulta da actividade humana. Dada as suas necessidades de manutenção o Homem encetou pela abertura do bosque e sub-bosque mediterrânicos permitindo o acesso a estes territórios aos animais de pastoreio e à produção agrícola. Este ecossistema está distribuído por uma faixa relativamente estreita, estando sobretudo restrita às áreas geográficas da Península Ibérica, Sul de França, Litoral Oeste de Itália e Extremo Norte de África. Actualmente o montado encontra-se em declínio devido a uma miríade de factores bióticos e abióticos, a actuarem isoladamente ou em combinação. Entre os factores destacam-se a actividade humana, as condições do solo, a acção de pragas e de agentes patogénicos. A seca e os fogos são, igualmente, factores que contribuem para o declínio deste ecossistema, sobretudo quando afectam árvores juvenis.

De entre os agentes patogénicos, e dada a natureza deste estudo, destaca-se o papel de *Phytophthora cinnamomi*. Trata-se de um agente patogénico pioneiro (o primeiro factor biótico a contribuir para o decadência de um hospedeiro) no ataque a *Quercus suber*, que invade igualmente muitas outras espécies da flora natural do bosque mediterrânico. É um agente patogénico particularmente eficaz no ataque às plantas juvenis de sobreiro, o que associado a factores como a fraca capacidade de regeneração natural desta espécie florestal e da quantidade de efectivos do fungo existentes no solo, têm contribuído para o insucesso da reflorestação (tanto por plantio como por sementeira). Este insucesso, provavelmente, poderá ser ultrapassado introduzindo nas áreas afectadas, exemplares resistentes (menos susceptíveis) e a micropropagação vegetativa poderá desempenhar um papel de importância relevante.

P. cinnamomi é uma espécie especialmente adaptada a climas quentes, que se encontra vastamente distribuída pelo globo terrestre, atribuindo-se para a sua dispersão geográfica um papel preponderante para as actividades humanas. Em Portugal esta espécie encontra-se disseminada pelos solos, peculiarmente, na região do Algarve, onde a prevalência desta doença no sobreiro é manifestamente maior que nas outras regiões do país. Este fungo desenvolve-se em grande escala nestes climas, nomeadamente, após precipitações intensas. Nestas condições os micélios desenvolvem estruturas de reprodução assexuada – os esporângios, que em estádios de maturação libertam unidades celulares móveis – os zoósporos. Os zoósporos são unidades de disseminação da infecção que são positivamente atraídas pelas raízes finas, situadas perto da superfície do solo, às quais aderem, enquistam e germinam. Da germinação do zoósporo surge a estrutura de invasão do fungo, que principia por ultrapassar as barreiras de protecção naturais (epiderme radicular), invade os espaços intercelulares, penetra ao nível intracelular, progride invadindo os tecidos adjacentes e mais tardiamente atinge os vasos condutores destruindo o câmbio. Nesta fase o fungo é capaz de provocar efeitos mais evidentes na árvore, aparecendo

sintomas como a diminuição do crescimento radicular, a diminuição do crescimento da planta em geral, a clorose das folhas, o aparecimento de necroses e cancos, por vezes, com exsudações de cor negra, que são os sintomas mais tardios da doença.

Não existe uma forma de tratamento unanimemente aceite para combater este agente patogénico. As formas de controlo (profilático ou de tratamento) são muito diversas podem incluir o controlo biológico (menos utilizado no campo) ou químico (o mais utilizado), podem ser utilizadas separadamente ou em combinação. As formas de controlo biológico recorrem maioritariamente a outros fungos (Basidiomicetas ou Hifomicetas), mas são relativamente ineficazes no efectivo controlo deste agente patogénico em situações de aplicação no campo. Os fungicidas utilizados para este fim podem ser biocidas irradiadores por supressão do *inoculum* ou fungicidas sistémicos. Actualmente é depositada grande esperança nos produtos biológicos com capacidade de induzirem resistência sistémica adquirida (SAR).

As medidas universalmente aceites no controlo da dispersão deste agente patogénico são as boas práticas de higiene fitossanitária e a quarentena.

A dificuldade de detecção e identificação deste agente patogénico prende-se com a necessidade de utilização de uma combinação de várias técnicas (ELISA, inspecção visual, exame microscópico, testes de engodo, isolamento, PAGE, PCR e RFLP) demoradas, dispendiosas e que requerem equipamento sofisticado e recursos humanos especializados.

É possível concluir tratar-se de um agente patogénico altamente destruidor da flora local, difícil de detectar e identificar e ainda de muito difícil controlo.

A interacção entre estas duas espécies ainda carece de alguma explanação. Os autores dividem-se entre tratar a espécie *P. cinnamomi* como não patogénica, moderadamente patogénica e muito patogénica. A relativa resistência das Quercíneas parece ser um factor comum nestes estudos. Provavelmente, a variação da patogenicidade inerente à natureza do próprio isolado, bem como, a variabilidade de *Q. suber* sejam os principais factores de contribuição para uma tão grande diferença de resultados entre estes autores.

Nos próximos capítulos procurar-se-á contribuir para algum esclarecimento acerca da interacção destas duas espécies.

2.INDUÇÃO E MANUTENÇÃO DE CULTURAS IN VITRO DE *QUERCUS SUBER*

2.1. INTRODUÇÃO

A totipotência é uma qualidade atribuída, em geral, às células vegetais e que se caracteriza pela capacidade de qualquer célula vegetal viva de reproduzir por completo a planta de onde é originária por um processo mitótico e de diferenciação regenerativa (DODDS e ROBERTS, 1986). Esta regeneração completa está na dependência do fornecimento de um meio nutritivo e de condições externas propícias.

O conceito de totipotência surge nos anos de 1838, 1839 e no início do século XX, surgem as primeiras tentativas de culturas *in vitro* de monocotiledóneas e crucíferas, nos anos 20 já se conseguiam culturas *in vitro* de embriões, partes de plantas e formação de tecido caloso em cenoura, nos anos 30 foi identificado o primeiro regulador de crescimento (IAA), e a partir da segunda metade do século XX desenvolveram-se consideravelmente as técnicas, o alcance em termos de espécies vegetais e o tipo de órgão explantado e induzido (DODDS e ROBERTS, 1986).

Dá-se o nome de cultura *in vitro*, a um tipo de cultura que se processa num ambiente artificial, isolado, perfeitamente controlado (por exemplo, usando frascos de cultura), num meio de cultura definido e sempre em condições de assepsia (ZÝRD, 1988).

Hoje, a cultura de tecidos é utilizada pelos fisiologistas do desenvolvimento, bioquímicos, citologistas, histologistas, geneticistas, fitopatologistas e melhoradores de plantas, tendo ainda grande valor, actual e potencial, em trabalhos de biotecnologia (HUSSEY, 1986; FOWLER, 1988; CHALEFF, 1988; DURZAN, 1988; BOCCON-GIBOD e JALOUZOT, 1989; RYAN e SCOWCROFT, 1989).

As vantagens que a propagação *in vitro* oferece nestes tipos de estudo reportam-se essencialmente à rapidez na obtenção de material vegetal previamente seleccionado, à quantidade de material vegetal que é possível produzir, à possibilidade de repetir o número de vezes necessárias os ensaios com o mesmo genótipo, à assepsia do material vegetal, à redução do espaço necessário para conduzir os estudos e à eliminação do efeito de sazonalidade, já que as condições físicas e nutritivas são controladas (DODDS e ROBERTS, 1986).

À propagação *in vitro* de genótipos seleccionados, utilizando a técnica de cultura de tecidos, dá-se o nome de micropropagação. Esta pode processar-se através de diferentes vias, como a cultura de meristemas, embriões, órgãos, tecido caloso, células e protoplastos, entre outras (BUTCHER e INGRAM, 1976; DODDS e ROBERTS, 1986; ZYRD, 1988; AUGÉ, 1989; BOCCON-GIBOD, 1989a e 1989b).

Para cada tipo de cultura parte-se de um órgão, parte de órgão ou tecido proveniente de material colhido no campo ou de sementeiras realizadas em laboratório e mantidas em estufa. Depois de sofrerem uma desinfecção superficial são colocados num meio de cultura apropriado. Os tecidos são então incubados numa estufa com luz, temperatura e humidade controladas. Após um período de cultura os tecidos são transferidos para meio novo em condições de assepsia.

2.1.1. Desinfecção Superficial

A desinfecção superficial tem por objectivos principais a remoção completa dos microrganismos e a indução do mínimo de prejuízos para o material vegetal. Na literatura consultada os autores recorreram a diferentes métodos de desinfecção superficial (Tabela 2-1).

Da leitura da Tabela 2-1 é possível inferir que consoante o tipo e a idade do material utilizado foram empregues métodos diferentes de desinfecção. Quanto mais jovem o material se tratava menos agressivo era o método de desinfecção utilizado.

Para material jovem era frequente a utilização de uma lavagem rápida com água corrente, seguida de uma passagem, igualmente, rápida por etanol a 70% (cerca de 30 s), seguida de um tratamento por Hipoclorito de Sódio ou de Cálcio (0,1-20%) e detergente (algumas gotas de Tween 20) durante 10 a 25 min. e finalmente por passagem em várias lavagens de água destilada estéril (3 ou 4 lavagens) (FERAUD-KELLER e ESPAGNAC, 1989, FERAUD-KELLER *et al.*, 1989;

MANZANERA e PARDOS, 1990; GONÇALVES e RAINHO, 1992; MANZANERA, 1992; FERNÁNDEZ-GUIJARRO *et al.*, 1995).

Tabela 2-1: Quadro resumo das metodologias utilizadas por diferentes autores para a desinfecção de órgãos e tecidos de *Quercus suber* e *Q. robur*.

Referências	Espécie	Material de origem da cultura	Método de desinfecção
FERAUD-KELLER e ESPAGNAC (1989)	<i>Quercus suber</i>	Plantas entre os 6 e os 8 meses obtidas a partir de landes recolhidas na Tunísia, cultivadas em estufa dos quais foram extraídos porções dos entrenós com um comprimento médio de 5 mm.	Lavagem rápida em água corrente, passagem rápida em etanol a 70%, seguido de tratamento durante 25 min. em hipoclorito de cálcio a 45 gL ⁻¹ seguida de três lavagens em água esterilizada.
FERAUD-KELLER <i>et al.</i> (1989)			
EL MAATAOUI e ESPAGNAC, (1989)	<i>Quercus suber</i>	Embriões zigóticos 0,06-5 mm foram removidos assépticamente a partir de landes colhidas nos Maciços Maures	Hipoclorito de Cálcio a 40%, durante 20 min.
GOMES (1989)	<i>Quercus suber</i>	Explantos de plantas jovens provenientes de semente.	Hipoclorito de Sódio a 10%, 10% de uma solução detergente (Teepol – 10g.L ⁻¹) durante 20 min. Seguida de passagem por etanol 70% durante 1 min. e lavagem por água desmineralizada três vezes
		Explantos de plantas adultas provenientes do campo	<i>Idem</i> ao anterior, mas substituir etanol por bicloreto de mercúrio a 0,05% durante 10 min. Ou Merpan e Benlate (dois fungicidas) seguido de Hipoclorito de Sódio a 10%, 10% de uma solução detergente (Teepol – 10g.L ⁻¹) durante 20 min. Seguida de passagem por etanol 70% durante 1 min. e lavagem por água desmineralizada três vezes
MANZANERA e PARDOS (1990)	<i>Quercus suber</i>	Segmentos apicais e nodais de plantas germinadas com 3 meses de idade, obtidas a partir de landes.	Material de origem jovem – solução de Hipoclorito de Sódio a 0,1 % e umas gotas de Tween 20, agitando durante 10 min., seguida de três lavagens em água destilada esterilizada.
		Material adulto entre 30-40 anos, rebentos com 2 a 5 cm de comprimento. Material adulto entre 75-115 anos, rebentos de estacas com alguns centímetros de comprimento.	Material de origem adulta – solução de cloreto de mercúrio a 0,2 % e umas gotas de Tween 20, agitando durante 2 min., seguida de lavagem em 2,44 gL ⁻¹ de CaCl ₂ e lavagem em 1 gL ⁻¹ de ácido ascórbico.
MANZANERA (1992)	<i>Quercus robur</i>	Landes maduras e imaturas.	Passagem durante 30 s em etanol a 70%, seguido de tratamento durante 20 min. em Hipoclorito de Sódio a 20% seguido de quatro lavagens em água destilada esterilizada.
		Folhas e entrenós de plântulas com um ou dois meses de idade.	
GONÇALVES e RAINHO (1992)	<i>Quercus suber</i>	Plantas com 4 a 9 meses	Passagem durante 30 s em etanol a 70%, seguido de tratamento durante 20 min. em hipoclorito de cálcio a 6% ou Hipoclorito de Sódio diluído 3x durante 10 min. Com algumas gotas de Tween 20, em agitação. Quatro lavagens em água destilada esterilizada. Os fragmentos permanecem numa solução de ácido ascórbico 1 gL ⁻¹ .
FERNÁNDEZ-GUIJARRO <i>et al.</i> (1995)	<i>Quercus suber</i>	Folhas apicais com pecíolos de plantas germinadas com 4 meses de idade. As landes eram provenientes de Salamanca, Espanha.	Lavagem durante 15 min. em 0,2% de Benlate® e 2% de Tween 20. Lavagem sob agitação em 10% de Hipoclorito de Sódio e algumas gotas de Tween 20, durante 15 min., seguida de três lavagens em água destilada esterilizada.

Para material adulto os métodos de desinfecção eram, necessariamente, mais agressivos e incluíam a utilização de uma solução de cloreto de mercúrio a 0,2% e umas gotas de detergente (Tween 20 ou Teepol) e agitação (GOMES, 1989 e MANZANERA e PARDOS, 1990). Para a desinfecção de landes, para colheita dos embriões zigóticos, os métodos eram igualmente agressivos (Hipoclorito de Cálcio a 40%, durante 20 min.) (EL MAATAOUI e ESPAGNAC, 1989).

No presente trabalho procedeu-se à comparação de dois métodos de desinfecção superficial e de uma combinação de tempos de exposição às soluções desinfectantes designadamente: com uma solução de Hipoclorito de Sódio e detergente (20% de lixívia comercial e 5 gotas de Teepol[®]) durante 15, 25 e 30 min. e; com uma solução Peróxido de Hidrogénio e detergente (30 % de água oxigenada 160 V e 5 gotas de Teepol[®]) durante 10, 15 e 20 min..

2.1.2. Meios de Cultura

Quanto aos meios de cultura, sabe-se que os meios aplicados em culturas *in vitro* variam de espécie para espécie e, por vezes, de órgão para órgão, mas há um certo número de requisitos comuns nos vários meios utilizados com fins distintos (WAREING e PHILLIPS, 1977).

A autotrofia, é a capacidade que as plantas possuem, que as distingue dos demais seres vivos, de produzirem substâncias orgânicas a partir do dióxido de carbono, da água e de nutrientes minerais.

Como as culturas *in vitro* são culturas de porções de plantas, e como os processos fotossintéticos dão-se em órgão específicos (sobretudo nas folhas), muitos dos explantes² são incapazes de sintetizarem as substâncias necessárias ao crescimento e ao desenvolvimento, daí que seja imperativo que estas substâncias sejam fornecidas no meio de cultura. Estes meios deverão ser constituídos pelo conjunto de todas as substâncias necessárias ao crescimento das culturas, tais como: nutrientes inorgânicos (macro e micronutriente), fontes de carbono (normalmente sacarose ou glicose), vitaminas, reguladores de crescimento e outros aditivos, em solução aquosa ou gelificada (WAREING e PHILLIPS, 1977; AUGÉ, 1989).

Na bibliografia relativa às culturas *in vitro* de *Q. suber* podem ser encontradas descrições de vários meios de composição diferente aplicados a esta espécie com o objectivo da obtenção de resultados distintos. Na Tabela 2-2 apresenta-se um resumo dos meios de cultura utilizados por diferentes autores para algumas espécies de *Quercus*.

² Explante: Entrada existente no Dicionário Verbo de Inglês Técnico e Científico de Joaquim Farinha dos Santos Tavares (1994, Lisboa, Editorial Verbo): *explant* (palavra de origem anglo-saxónica utilizada em Botânica) com a correspondência para a palavra portuguesa explante (página 154). Alternativamente pode ser utilizada a palavra explantado (entrada existente na Grande Enciclopédia Portuguesa e Brasileira Ilustrada de Perdigão Pinto, 1989, Volume X, página 751, termo aplicado em Biologia que significa pequena porção de tecido que se extrai dos órgãos para serem cultivados). Alguns autores nacionais, consultados (ROMANO *et al.*, 1992; ROMANO, 1994) aplicam a palavra explantado, enquanto outros utilizam a palavra explante (ex: GOMES, 1989). Ao longo do texto o termo *explant* é referido como explante.

Tabela 2-2: Resumo dos meios de cultura utilizados por diferentes autores para as espécies de *Quercus*.

Referências	Espécie	Meio de cultura base	Vitaminas e/ou Suplementos
FERAUD-KELLER e ESPAGNAC (1989) FERAUD-KELLER et al. (1989)	<i>Quercus suber</i>	MS ³	Caseína hidrolisada 1 gL ⁻¹ .
GOMES (1989)	<i>Quercus suber</i>	CD ⁴	-
		GD ⁵	Tiamina.HCl (1mgL ⁻¹), Nicotianamida (0,1mgL ⁻¹) Piridoxina (0,1mgL ⁻¹)
		GDFL	FL ⁶
		MS	Tiamina.HCl (10mgL ⁻¹), Nicotianamida (0,5mgL ⁻¹) Piridoxina (0,5mgL ⁻¹)
		½ MS	Tiamina.HCl (10mgL ⁻¹), Nicotianamida (0,5mgL ⁻¹) Piridoxina (0,5mgL ⁻¹)
		¼ MS	Tiamina.HCl (10mgL ⁻¹)
MANZANERA e PARDOS (1990)	<i>Quercus suber</i>	Macronutrientes: Heller; Schenk e Hildebrandt; Lepoivre; MS; GD; Sommer et al.; Durzan et al. Micronutrientes: MS.	Ácido ascórbico 1,76 mgL ⁻¹ Ácido nicotínico 1 mgL ⁻¹ Mio-inositol 100 mgL ⁻¹ Patotenato de cálcio 1 mgL ⁻¹ Piridoxina 1 mgL ⁻¹ Tiamina 1 mgL ⁻¹
CHALUPA (1990)	<i>Quercus robur</i>	WPM e MS	Glutamina 200 mgL ⁻¹
BRISON e LAMANT (1990)	<i>Quercus rubra</i>	Macronutrientes: Heller; Schenk e Hildebrandt; Lepoivre; MS; GD; Sommer et al.; Durzan et al. Micronutrientes: MS.	Caseína hidrolisada 150 mgL ⁻¹
EL MAATAOUI e ESPAGNAC (1989)	<i>Quercus suber</i>	MS	-
FERNÁNDEZ-GUIJARRO et al. (1995)	<i>Quercus suber</i>	Macronutrientes: ½ MS, Schenk e Hildebrandt ½ ou completo; Gamborg ½ ou completo. Micronutrientes: MS.	MS.
GONÇALVES e RAINHO (1992)	<i>Quercus suber</i>	Estabelecimento – MS	Mio-inositol 100 mgL ⁻¹
		Multiplicação – Heller modificado; WPM; Anderson modificado	
		Enraizamento – ½ GD	
ROMANO et al. (1992)	<i>Quercus suber</i>	Meio de iniciação – GD e 1 mgL ⁻¹ BAP	-
		Meio de multiplicação – GD + BAP ⁷ + IAA ⁸	
		Meio de enraizamento – imersão em auxina e passagem para meio sem hormonas	
ROMANO (1994)	<i>Quercus suber</i>	MS; GD; WPM ⁹	-
OSTROLUKÁ e BEZO (1994)	<i>Quercus sp.</i>	WPM MS	-
MANZANERA (1992)	<i>Quercus robur</i>	WPM	Ácido ascórbico e Glutamina (filtrados por 0,22 µm)
PUIGDERRAJOIS et al. (1996)	<i>Quercus suber</i>	Macronutrientes – Shenk e Hildebrandt	MS
		Micronutrientes – MS	

³ MS – Murashige e Skoog, meio de⁴ CD – Campbell e Durzan, meio de⁵ GD – Gresshof e Doy, meio de (ver Tabela 2-7)⁶ FL – Fossard e Lee, vitaminas de (ver Tabela 2-7)⁷ BAP – 6-benzilaminopurina⁸ IAA – Ácido indolil-3-acético⁹ WPM – Woody Plant Medium (ver Tabela 2-7)

Os meios utilizados para culturas de *Quercus suber* podem ser desde meios complexos (macronutrientes, micronutrientes e vitaminas) (FERAUD-KELLER e ESPAGNAC 1989, FERAUD-KELLER *et al.*, 1989; GOMES, 1989; MANZANERA e PARDOS, 1990; GONÇALVES e RAINHO, 1992; MANZANERA, 1992; FERNÁNDEZ-GUIJARRO *et al.*, 1995; PUIGDERRAJAIS *et al.*, 1996) a meios pouco complexos (apenas macro e micronutrientes) (EL MAATAOUI e ESPAGNAC, 1989; ROMANO *et al.*, 1992; ROMANO, 1994). Para a espécie *Q. suber* os meios mais consensuais são os de Gresshoff e Doy (GD), Murashige e Skoog (MS) e Woody Plant Medium (WPM).

Na regeneração *in vitro* de lenhosas, em geral, o meio deverá conter pelo menos 25 mM de nitrato de potássio e entre 2 a 20 mM de amónia, uma concentração entre 1 e 3 mM de cálcio, sulfato e magnésio são normalmente adequadas e os micronutrientes necessários são o iodo, o boro, o manganês, o zinco, o molibdénio, o cobre, o cobalto e o ferro. No caso das culturas de *Quercus suber* a concentração de cálcio deverá estar mais próxima do limite inferior (GOMES, 1989). Segundo ROMANO (1994) os meios de Murashige e Skoog (1962), de Gresshoff e Doy (1972) e o meio Woody Plant Medium descrito por Lloyd e McCown (1980), têm sido frequentemente usados na micropropagação de diferentes lenhosas.

Por vezes, a adição de aminoácidos como a L-glutamina e casaminácidos tem-se revelado favorável (ZÝRD, 1988).

No presente estudo houve a necessidade de otimizar os meios de cultura para a produção de porções aéreas, tecido caloso e plântulas. Com esse objectivo foram usados dois meios base diferentes (meio de Gresshoff e Doy modificado e com vitaminas de Fossard e Lee) e WPM (Woody Plant Medium, meio de Loyd e McCown modificado), ambos, contendo como aditivos o mio-inositol, a glutamina e a caseína hidrolisada. A modificação introduzida nos dois meios de cultura base dizia respeito à redução da concentração em cálcio de acordo com a recomendação de GOMES (1989).

2.1.3. Fonte de Carbono e Forma de Suporte

A incapacidade ou a diminuta produção fotossintética dos explantes obriga ao suplemento dos meios de cultura com uma fonte de carbono (como sejam o monossacarídeo glicose, ou o di-holósido sacarose) de forma a permitir o crescimento e o desenvolvimento dos tecidos *in vitro*.

Na Tabela 2-3 apresenta-se um resumo das fontes de carbono e formas de suporte utilizadas pelos diferentes autores nas culturas *in vitro* de espécies de *Quercus*.

Relativamente à fonte de carbono, os autores consultados, maioritariamente optaram pela utilização da sacarose na proporção de 30 gL⁻¹ (GOMES, 1989; MANZANERA e PARDOS, 1990; GONÇALVES e RAINHO, 1992; PUIGDERRAJAIS *et al.*, 1996), de 20 gL⁻¹ (ROMANO, 1994) ou

de 10 gL⁻¹ (FERNÁNDEZ-GUIJARRO *et al.*, 1995). Alguns autores optaram pela utilização de glicose na proporção de 20 gL⁻¹ (FERAUD-KELLER e ESPAGNAC 1989, FERAUD-KELLER *et al.*, 1989) ou de 10 gL⁻¹ (EL MAATAOUI e ESPAGNAC, 1989).

Tabela 2-3: Resumo das fontes de carbono e formas de suporte utilizadas pelos diferentes autores nas culturas *in vitro* de espécies de *Quercus*.

Referência	Espécie	Fonte de carbono	Forma de suporte
FERAUD-KELLER e ESPAGNAC (1989) FERAUD-KELLER <i>et al.</i> (1989)	<i>Quercus suber</i>	20 gL ⁻¹ de glicose.	8 gL ⁻¹ de gelose.
EL MAATAOUI e ESPAGNAC (1989)	<i>Quercus suber</i>	30 gL ⁻¹ de glicose	7 gL ⁻¹ de gelose,
GOMES (1989)	<i>Quercus suber</i>	20 gL ⁻¹ de sacarose	7 gL ⁻¹ de agar 6 gL ⁻¹ de agar (Meristemóides)
CHALUPA (1990)	<i>Quercus robur</i>	2-3% de sacarose	0,6 % de agar
BRISON e LAMANT (1990)	<i>Quercus rubra</i>	55 mM glicose e 30mM sacarose	0,7% agarose ou 0,7% de agar
MANZANERA e PARDOS (1990)	<i>Quercus suber</i>	30 gL ⁻¹ de sacarose	6 gL ⁻¹ de agar
MANZANERA (1992)	<i>Quercus robur</i>	-	8 gL ⁻¹ de agar ou meio líquido
GONÇALVES e RAINHO (1992)	<i>Quercus suber</i>	30 gL ⁻¹ de sacarose	6 gL ⁻¹ de agar
ROMANO (1994)	<i>Quercus suber</i>	20 gL ⁻¹ de sacarose	7 gL ⁻¹ de agar
OSTROLUCKÁ e BEZO (1994)	<i>Quercus sp.</i>	2-3% de sacarose	0,6 % de agar
FERNÁNDEZ-GUIJARRO <i>et al.</i> (1995)	<i>Quercus suber</i>	10 gL ⁻¹ de sacarose	6 gL ⁻¹ de agar
PUIGDERRAJOIS <i>et al.</i> (1996)	<i>Quercus suber</i>	30 gL ⁻¹ de sacarose	6 gL ⁻¹ de agar

Relativamente à forma de suporte, os autores consultados, maioritariamente optaram pela utilização de 6 gL⁻¹ de agar (MANZANERA e PARDOS, 1990; GONÇALVES e RAINHO, 1992; FERNÁNDEZ-GUIJARRO *et al.*, 1995; PUIGDERRAJOIS *et al.*, 1996; CHALUPA, 1990; OSTROLUCKÁ e BEZO, 1994) ou de 7 gL⁻¹ (EL MAATAOUI e ESPAGNAC, 1989; GOMES, 1989; ROMANO, 1994; BRISON e LAMANT, 1990). FERAUD-KELLER e ESPAGNAC (1989), FERAUD-KELLER *et al.* (1989) e EL MAATAOUI e ESPAGNAC (1989) optaram pela utilização de gelose na proporção de 8 gL⁻¹ e 7 gL⁻¹, respectivamente. Em 1992, MANZANERA, optou pela cultura em meio líquido e em meio sólido (8 gL⁻¹ de agar) de *Quercus robur*.

No presente estudo optou-se pela utilização de 20 gL⁻¹ de sacarose e de 6 gL⁻¹ de agar, nos meios testados. Em estudos preliminares foi registada uma duplicação da rentabilidade das culturas quando se reduzia a quantidade de agar no meio de cultura de 7 para 6 gL⁻¹.

2.1.4. Potencial Hidrogeniônico, Condições Esterilização dos Meios de Cultura e de Incubação

Factores físicos de crescimento como fotoperíodo, densidade de fluxo de fotões, temperatura, pH do meio, concentração de oxigénio, de dióxido de carbono e de etileno, são também determinantes para o desenvolvimento das culturas.

Na bibliografia consultada (Tabela 2-4), os autores referiram ajustar o potencial hidrogeniônico (pH), para valores entre 5,5 e 5,8, antes de autoclavarem os meios de cultura (FERAUD-KELLER e ESPAGNAC 1989; FERAUD-KELLER *et al.*, 1989; EL MAATAOUI e ESPAGNAC, 1989; MANZANERA e PARDOS, 1990; GONÇALVES e RAINHO, 1992; MANZANERA, 1992; ROMANO, 1994; FERNÁNDEZ-GUIJARRO *et al.*, 1995; PUIGDERRAJOS *et al.*, 1996). A esterilização por calor húmido era conduzida entre 15 e 24 min. a uma temperatura de 110-121°C.

Tabela 2-4: Resumo dos valores de pH, condições de esterilização dos meios de cultura e de incubação utilizados pelos diferentes autores nas culturas *in vitro* de espécies de *Quercus*.

Referências	Espécie	pH	Incubação
FERAUD-KELLER e ESPAGNAC (1989) FERAUD-KELLER <i>et al.</i> (1989)	<i>Quercus suber</i>	5,6 antes de autoclavar (15 min. a 110°C).	Sala climatizada a 25°C; Fotoperíodo de 16h
EL MAATAOUI e ESPAGNAC (1989)	<i>Quercus suber</i>	5,6 antes de autoclavar (15 min. a 110°C).	Sala climatizada a 25-28°C; Obscuridade.
GOMES (1989)	<i>Quercus suber</i>	-	Ciclo 16h dia/8h noite, temperatura diurna 24 ± 2°C e nocturna 22 ± 2°C
BRISON e LAMANT (1990)	<i>Quercus rubra</i>	5,6 antes de autoclavar	Ciclo 16h dia/8h noite, 23° ± 1° C
CHALUPA (1990)	<i>Quercus robur</i>	5,8	Ciclo 16h dia/8h noite, 24° C
MANZANERA e PARDOS (1990)	<i>Quercus suber</i>	5,5-5,7 antes de autoclavar (20 min. a 115°C).	Temperatura diurna de 25°C e nocturna de 20°C. Fotoperíodo de 14h
MANZANERA (1992)	<i>Quercus robur</i>	-	Temperatura diurna de 25°C e nocturna de 27°C. Fotoperíodo de 16h
GONÇALVES e RAINHO (1992)	<i>Quercus suber</i>	5,5 antes de autoclavar (15 min. 121°C)	Estufa mantida a temperatura diurna de 25°C e nocturna de 18°C. Fotoperíodo de 16h.
ROMANO (1994)	<i>Quercus suber</i>	5,8 antes de autoclavar (20 min. a 120°C).	-
OSTROLUCKÁ e BEZO (1994)	<i>Quercus sp.</i>	5.5-5.7	Ciclo 16h dia/8h noite, 25° C
FERNÁNDEZ-GUIJARRO <i>et al.</i> (1995)	<i>Quercus suber</i>	5,7 antes de autoclavar (23 min. e 40 s a 114°C).	Câmara 25±1°C. Fotoperíodo 16 h
PUIGDERRAJOS <i>et al.</i> (1996)	<i>Quercus suber</i>	5,7 antes da autoclavar (20 min 121°C)	Fitotron a 25°C±1°C. Fotoperíodo 16h

Para salvaguardar a manutenção das condições de assepsia, é igualmente necessário proceder à esterilização dos meios de cultura, sendo o processo geralmente aplicado, a autoclavagem. Deve-se ter em atenção, que nos meios usados para cultura *in vitro* fazem parte compostos termolábeis, como o caso das vitaminas, aplicando-se neste caso um processo de esterilização diferente (ultrafiltração), após o qual se adicionam ao meio autoclavado.

Os diferentes autores consultados procediam à incubação em salas ou câmaras climatizadas com temperatura constante (23°-25°C) ou variável (temperatura diurna 25°C e nocturna 18-27°C) e fotoperíodos de 14-16 h. Em 1989, EL MAATAOUI e ESPAGNAC, obtiveram calo amorfo, compacto e esbranquiçado, sem potencial morfogénico, mantendo as culturas na obscuridade.

No presente estudo o pH dos meios de cultura foi ajustado a 5,7 antes da autoclavagem. A esterilização dos meios (sem as vitaminas) foi conduzida a 1 atm, 120° C durante 20 min.. As vitaminas foram esterilizadas por filtração por membrana de 0,22 µm (membrana de nitrato de celulose, Sartorius®) e adicionadas antes de proceder à distribuição dos meios. As culturas foram iniciadas e mantidas numa sala de cultura com condições de temperatura e de luminosidade controladas. A temperatura foi de 22 ± 1° C e o fotoperíodo de 16 h, com a excepção das culturas de tecido caloso que foram mantidas à mesma temperatura, mas sob condições de obscuridade.

2.1.5. Reguladores de Crescimento

Os reguladores de crescimento apresentam actividade fisiológica relacionada com o controlo do crescimento das plantas, como é o caso das auxinas, citocininas, giberelinas e o etileno.

As auxinas são compostos que promovem o crescimento longitudinal, pois que promovem o alongamento celular (AUGÉ, 1989).

Nas plantas, os compostos isolados com propriedades auxínicas foram os ácidos indolil-3-acético, indolil-3-butírico e fenilacético (IAA, IBA e PAA, respectivamente) (SLATER *et al.*, 2003 e LEUBA e LETOURNEAU, 1990). Estes compostos são produzidos nos órgãos jovens da planta (esboços de folhas e flores, botões activos e frutos jovens) e a sua circulação dá-se do topo para a base (AUGÉ, 1989). Os seus efeitos fisiológicos nas plantas são múltiplos, dentro dos quais se destacam o alongamento celular, a modificação da permeabilidade da membrana plasmática, a actividade no metabolismo em geral (intervenção na síntese de RNA ribossómico), a acção sobre as células cambiais, o aumento da concentração em etileno, a alteração do tropismo, a intervenção na partenocarpia, a iniciação floral, o atraso dos fenómenos de abscisão e a acção rizogénica (AUGÉ, 1989). Entre outras substâncias auxínicas, de referir que a grande maioria das auxinas sintéticas possuem actividade herbicida, como é o caso dos ácidos

2,4-diclorofenoxiacético, 2,4,5-triclorofenoxiacético, 2-metoxi-3,6-dicloroenzóico, 2-metil-4-clorofenoxiacético e 4-amino-2,5,6-tricloropicolínico (2,4-D, 2,4,5-T, Dicamba, MCPA e Picloram, respectivamente) (Slater *et al.*, 2003). O efeito nocivo destes compostos sobre algumas plantas deve-se ao seu efeito tóxico, designadamente: na inibição do alongamento celular; na promoção de anomalias no crescimento; na descoloração das folhas e na formação de tumores (AUGÉ, 1989).

No domínio das culturas *in vitro*, as auxinas ocupam um lugar muito importante dado as suas propriedades essenciais relativamente à multiplicação celular e ao efeito rizogénico. Na Tabela 2-5 apresentam-se em síntese as auxinas mais comumente utilizadas, bem como as suas abreviaturas e designações químicas.

Tabela 2-5: Auxinas comumente utilizadas, suas abreviaturas e designação química.

[Adaptado de SLATER *et al.* (2003)]

Abreviatura/Designação	Designação Química
IAA ^a	Ácido indolil-3-acético
IBA ^a	Ácido indolil-3-butírico
PAA ^a	Ácido fenilacético
NAA ^b	Ácido 1-naftaleno-acético
NOA ^b	Ácido 2-naftiloxiacético
2,4-D ^{b,c}	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2,4,5-T ^{b,c}	Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético
Dicamba ^c	Ácido 2-metoxi-3,6-dicloroenzóico
MCPA ^c	Ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético
Picloram ^c	Ácido 4-amino-2,5,6-tricloropicolínico

^a Auxina de ocorrência na natureza

^b Análogo sintético

^c Herbicida com propriedades auxínicas

As citocininas provocam um aumento das multiplicações celulares e a formação de rebentos (AUGÉ, 1989).

A estrutura básica destes reguladores de crescimento é um anel de purina. Nas plantas, os compostos isolados com propriedades citocinínicas foram os compostos [N6-(2-isopentil)adenina] e 4-hidroxi-3-metil-trans-2-butenilaminopurina (IPA e Z, respectivamente) (SLATER *et al.*, 2003). São produzidos nos órgãos jovens da planta (esboços de folhas, botões activos, ápices radiculares e embriões) (AUGÉ, 1989). Os seus efeitos fisiológicos nas plantas são inúmeros, dentro dos quais se destacam a estimulação das divisões celulares, o papel na organogénese, a estimulação na síntese proteica, o atraso dos fenómenos de senescência, o antagonismo da dominância apical, a manutenção das culturas por tempo indeterminado e o papel na diferenciação tecidual (AUGÉ, 1989).

Os compostos de síntese mais usados são a benzilaminopurina (BAP) e a cinetina (K). As citocininas constituem, sob o ponto de vista das culturas *in vitro*, um elemento muito importante no progresso da multiplicação vegetativa. Na Tabela 2-6 apresenta-se em síntese as citocininas mais comumente utilizadas, bem como as suas abreviaturas e designações químicas.

Tabela 2-6: Citocininas comumente utilizadas, suas abreviaturas e designação química.
[Adaptado de SLATER *et al.* (2003)]

Abreviatura/Designação	Designação Química
2iP (IPA)^a	[N6-(2-isopentil)adenina]
Zeatina (Z)^a	4-hidroxi-3-metil-trans-2-butenilaminopurina
Cinetina (K)^b	6-furfurilaminopurina
BAP^b	6-benzilaminopurina
Tidiazuron (TDZ)^c	1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)-ureia

^a Citocinina de ocorrência na natureza

^b Análogo sintético

^c uma citocinina do tipo fenilureia substituída

Classicamente, atribui-se às auxinas o papel de indução do aumento do volume celular e às citocininas a função de regulação dos processos de divisão celular. Actualmente, sabe-se que nenhum regulador de crescimento é, por si só, responsável por determinado efeito (AUGÉ, 1989). A divisão das células vegetais requer tanto a presença de auxinas como de citocininas, embora as últimas tenham efeito mais relevante na indução da divisão, são ineficazes na ausência das primeiras. O efeito destes reguladores na divisão celular varia com a substância, com a sua concentração e com o estágio de diferenciação celular.

Desde que em 1957, Skoog e Miller (citados por DODDS e ROBERTS, 1986), descobriram que a formação de rebentos podia ser induzida a partir de tecido caloso de tabaco, usando níveis relativamente baixos de auxina e níveis relativamente elevados de citocinina no meio de cultura, muitos aspectos da diferenciação celular e organogénese em culturas de tecidos ou órgãos foram dados como controlados pela interacção auxina:citocinina (DODDS e ROBERTS, 1986). O esquema proposto por Skoog e Miller, em que a regulação do desenvolvimento era conseguida alterando o balanço auxina:citocinina, verifica-se na grande maioria dos casos (Fig. 2-1).

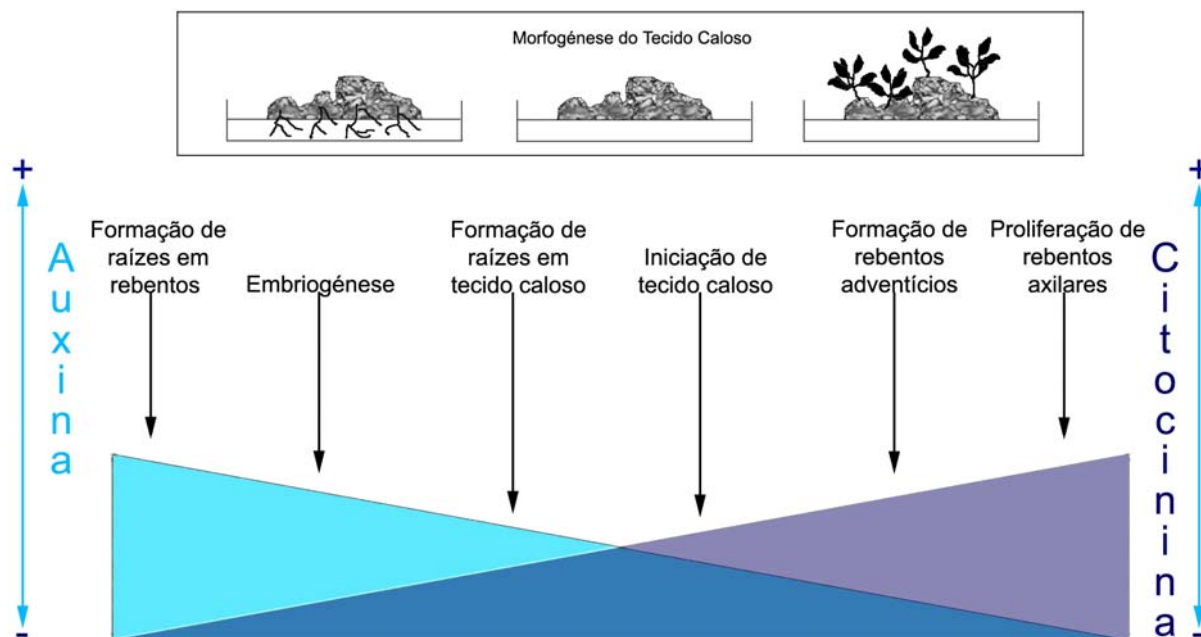


Fig. 2-1: Balanço entre a concentração de auxina e citocinina, necessário para a obtenção de diferentes respostas morfológicas.
[Adaptado de SLATER *et al.* (2003) e de GEORGES (1993)].

De acordo com este balanço podem ocorrer três situações: se a razão auxina:citocinina for superior a 1, verifica-se rizogénese (formação de raízes); se a razão auxina:citocinina for inferior a 1, verifica-se o desenvolvimento de rebentos; finalmente, se a razão auxina:citocinina for próxima de 1, ocorre a produção de tecido caloso.

As proporções de auxinas e de citocininas nem sempre produzem os resultados presentes no esquema da Fig. 2-1, variando o tipo de resposta com a espécie, as condições de cultura e de acordo com os restantes compostos usados nos meios de cultura.

Os reguladores de crescimento mais utilizados para promover o crescimento *in vitro* são as citocininas 6-benzilaminopurina (BAP), a cinetina (K), 2-isopenteniladenina (2-iP) e zeatina (Z), individualmente ou em combinação com as auxinas ácidos indolacético (IAA), indolbutírico (IBA), naftalenoacético (NAA) e 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

As giberelinas têm, geralmente, como efeito a promoção do alongamento dos entrenós e do crescimento de meristemas e gemas, inibindo a indução de rebentos adventícios (AUGÉ, 1989). Podem também ter como efeito a quebra de dormência de gemas (AUGÉ, 1989). A giberelina mais empregue é o ácido giberélico (GA₃).

O ácido abscísico (ABA) possui geralmente efeito inibidor do crescimento, tendo-se verificado que estimulava a formação de tecido caloso e a embriogénese em algumas espécies (AUGÉ, 1989).

Para além destes reguladores de crescimento, existem outros compostos com capacidade fitorreguladora, como por exemplo as oligossacarinas, as poliaminas, a fenilureia e as anti-auxinas (AUGÉ, 1989).

Na cultura *in vitro*, os compostos orgânicos mais críticos são o tipo de reguladores de crescimento (auxinas, citocininas, giberelinas e ácido abscísico) e a sua proporção relativa. Remete-se o leitor para a secção 4.1.3. (Capítulo 4), na qual estão descritos os papéis dos reguladores de crescimento na indução de resistência/susceptibilidade na interacção parasita/hospedeiro.

Neste trabalho foram utilizados três tipos diferentes de auxina (IAA, NAA e IBA) e um tipo de citocinina (NAA) de acordo com o tipo de cultura pretendido. No capítulo 5 são abordadas as importâncias relativas dos diferentes rácios auxina:citocinina (NAA:BAP) experimentados na interacção do tecido caloso de *Q. suber* com o agente patogénico *P. cinnamomi*.

2.1.6. Regeneração *In Vitro*

Dependendo do tipo de explante inicial e da composição do meio utilizado para a cultura *in vitro*, os processos de regeneração que podem ocorrer são três: a organogénese (formação de raízes e rebentos), a embriogénese (formação de embriões) e a calogénese (formação de tecido caloso).

Para este estudo os processos de regeneração que importam discutir são a formação de porções aéreas e de raízes e a formação de tecido caloso.

Na organogénese e na embriogénese são mantidas as características da planta original, uma vez que, o processo de desenvolvimento e crescimento do explante, ocorre de forma comparável ao da planta que lhe deu origem. Os tecidos são diferenciados em camadas tecidulares distintas e vasos condutores.

Na calogénese, contrariamente às culturas de órgãos e de embriões, o explante perde as características morfológicas dos tecidos intactos originais. Forma-se uma massa de tecido indiferenciado, intrincado, no qual as células são idênticas umas às outras e a presença de células diferenciadas é rara ou nula (dependendo da espécie em cultura).

FERAUD-KELLER e ESPAGNAC (1989) e FERAUD-KELLER *et al.* (1989) obtiveram calo esbranquiçado de *Q. suber* que se tornava clorofilino, onde apenas 3% produziam pequenos rebentos, em meios suplementados com 2 mgL⁻¹ de IBA e 2 mgL⁻¹ de BAP. No mesmo ano, EL MAATAOUI e ESPAGNAC, a partir de embriões zigóticos de *Q. suber* e em meios suplementados com 0,5 mgL⁻¹ de IBA e 2 mgL⁻¹ de BAP, obtiveram de calo amorfo, compacto e esbranquiçado,

sem potencial morfogénico, baixa percentagem de formação de embriões somáticos em estado globular e cordiforme e melhores percentagens para embriões zigóticos em estado cotiledonário.

MANZANERA e PARDOS (1990) obtiveram rebentos e indução de enraizamento, para regeneração *in vitro* de plântulas de *Q. suber*. Estes autores verificaram que o meio de Murashige e Skoog era incapaz de produzir rebentos e o meio de Sommer *et al.* era mais eficaz. Utilizaram várias combinações de reguladores de crescimento (0, 0,1, 0,5 e 1 e 5 mgL⁻¹ de BA e 0, 0,01, 0,1 e 0,5 mgL⁻¹ de NAA) e concluíram que o IBA era melhor que o NAA para o enraizamento (MANZANERA e PARDOS, 1990).

GOMES (1989) utilizou BAP (0,5-2 mgL⁻¹) para a indução de porções aéreas e zeatina (1 mgL⁻¹) para o seu alongamento. Este autor, não observou vantagens na adição de auxinas ao meio de cultura.

GONÇALVES e RAINHO (1992) utilizaram plântulas de *Q. suber* com 4 a 9 meses e diferentes combinações de reguladores de crescimento para três fases de desenvolvimento *in vitro*: Estabelecimento – NAA e BAP (0, 0,2, 1 e 2 mgL⁻¹); Multiplicação – BAP (0,02, 0,1, 0,2, 0,5 e 2,5 mgL⁻¹); Enraizamento – IBA (1, 5, 10 mgL⁻¹) durante 7 dias seguida de passagem para meio sem reguladores de crescimento ou imersão em IBA. Segundo estes autores, para a multiplicação, o melhor meio era o de Heller modificado, com a adição de 0,2 mgL⁻¹ de BAP. Para o enraizamento os métodos de indução durante 7 dias como o de imersão resultaram em boas percentagens de enraizamento (GONÇALVES e RAINHO, 1992).

Em 1994, ROMANO, utilizou gemas axilares ou apicais de *Q. suber* em meios suplementados com 0,5 mgL⁻¹ de BAP e 0,1 mgL⁻¹ de IAA tendo obtido como resultado a multiplicação das gemas axilares ou apicais com formação de um ou múltiplos rebentos.

Em 1995, FERNÁNDEZ-GUIJARRO *et al.* utilizaram folhas dos ápices com pecíolos de plântulas de *Q. suber* com 4 meses de idade em meios contendo 0,2 mgL⁻¹ de BA ou ausência de reguladores de crescimento. Estes autores obtiveram embriões somáticos a partir de embriões zigóticos, de segmentos nodais e folhas o que denota uma capacidade elevada dos tecidos de *Q. suber* para embriogénese somática. Nesse estudo foi, ainda, possível obter embriogénese secundária (FERNÁNDEZ-GUIJARRO *et al.*, 1995). Resultados semelhantes obtiveram PUIGDERRAJOIS *et al.* (1996) conseguiram embriogénese secundária a partir embriões somáticos imaturos mantidos em culturas embriogénicas de folhas de *Q. suber*.

No decorrente estudo, interessa referir que os processos de regeneração nas culturas *in vitro* de *Quercus suber* utilizados foram por um lado a formação de porções aéreas (estudo da patogenicidade) e posterior indução de raízes para obtenção de plântulas (estudo da patogenicidade) e, finalmente, a formação de tecido caloso (estudo da interacção *Q. suber*-*P.cinnamomi*).

2.2. METODOLOGIA

2.2.1. Condições de Colheita, Transporte, Armazenagem e Origem do Material Vegetal

Foram colhidas, landes e pequenos ramos com rebentos tanto de árvores entre os 30-40 anos como de árvores com mais de 75 anos. Este material foi recolhido em caixas isotérmicas, transportado para o laboratório onde foi tratado, etiquetado, e devidamente armazenado.

No que respeita aos ramos, a colheita foi feita de manhã: as folhas foram removidas, formando-se conjuntos de varas de 20 cm de comprimento. Estas varas foram acondicionadas em sacos plásticos e guardados em caixas isotérmicas. Quando chegados ao laboratório, os sacos foram devidamente etiquetados e armazenados a 4° C.

Para as landes, a colheita tem de ser feita na segunda camada de frutificação (meses de Novembro-Dezembro) e o transporte foi feito em caixas de cartão. Quando em laboratório, as landes foram escolhidas, lavadas e a cúpula foi removida. As landes, assim tratadas, foram secas em papel de filtro, separadas por lotes e armazenadas em embrulhos feitos de papel de jornal. O armazenamento foi feito a 4° C.

No que respeita à origem das landes e do material adulto, foram escolhidas várias estações em diferentes zonas do país (Anexo II).

A variedade de origens do material vegetal, em primeiro lugar, teve como objectivo a garantia de uma maior variabilidade genética e, em segundo lugar, foi conveniente para a investigação em termos de acessibilidade (Aveiro), permissão para a colheita (Herdade da Defesa-de-Cima e outros locais em Montemor-o-Novo, vários locais de Ponte-de-Sôr, Quinta da Casa Grande de Pinhovelo, Macedo de Cavaleiros) ou facilidade de acesso (landes do CENASEF – Centro Nacional de Sementes Florestais, Amarante).

2.2.2. Origem do Material Vegetativo Jovem

O material vegetativo de origem jovem, abreviadamente designado por material jovem, é o resultado da germinação de landes em sala de cultura (Fig. 2-2). Procedeu-se à sementeira das landes, fazendo uma hidratação prévia durante cerca de 48 h, com água corrente e arejamento do recipiente. Seguidamente, as landes foram semeadas em vasos com cerca de 15 cm de altura e 7

cm de diâmetro, usando como suporte areia pré-tratada com ácido, lavada com água destilada e esterilizada. Os vasos foram colocados numa sala climatizada (temperatura $24 \pm 1^\circ \text{C}$, fotoperíodo 16 horas de luz) onde permaneceram até que as jovens plantas atingissem uma altura de cerca de 50 cm (3 a 9 meses). Nesta altura, cortaram-se porções contendo o ápice e cerca de 4 segmentos de entrenó.



Fig. 2-2: Plantas juvenis germinadas a partir de landes.

As landes foram semeadas em vasos com cerca de 15 cm de altura e 7 cm de diâmetro. O suporte era constituído por areia pré-tratada com ácido, lavada e esterilizada. A germinação e crescimento das plantas decorrem numa sala climatizada (temperatura $24 \pm 1^\circ \text{C}$, fotoperíodo 16 de luz) onde permanecem até que atingissem uma altura de cerca de 50 cm (3 a 9 meses).

2.2.3. Origem Material Vegetativo Adulto

O material vegetativo de origem adulta, abreviadamente designado por material adulto, é o resultado do desenvolvimento de gomos axilares dos ramos que foram colhidos no campo (Fig. 2-3). As varas de 20 cm de comprimento foram colocadas em recipientes com água e arejamento do recipiente. As varas, assim, acondicionadas foram colocadas numa sala climatizada (temperatura $24 \pm 1^\circ \text{C}$, fotoperíodo 16 de luz) e aspergidas diariamente, onde permaneceram até que os rebentos, resultantes dos gomos axilares, atingissem um comprimento de cerca de 5 cm. Nesta altura, destacaram-se os rebentos das varas que seguiam para a iniciação das culturas *in vitro*.



Fig. 2-3: Material vegetativo de origem adulta. Desenvolvimento de gomos axilares dos ramos que foram colhidos no campo. Varas de 20 cm de comprimento, colocadas em recipientes com água e arejamento do recipiente, mantidas numa sala climatizada (temperatura $24 \pm 1^\circ \text{C}$, fotoperíodo 16 de luz) e aspergidas diariamente. Quando os rebentos atingem um comprimento de cerca de 5 cm, são excisados para se iniciarem as culturas *in vitro*.

2.2.4. Métodos de Desinfecção Superficial do Material Vegetal

Para iniciar as culturas *in vitro*, o material vegetal (jovem e adulto) foi sujeito a uma pré-desinfecção de superfície, que consistia numa lavagem por água corrente e passagem por etanol a 96° , durante 1 min.. A passagem do etanol para o método de desinfecção, propriamente dito, foi executada numa câmara de fluxo laminar vertical.

No processo de desinfecção foram tentados dois métodos. O primeiro método consistiu na utilização de uma solução de Hipoclorito de Sódio e detergente (20% de lixívia comercial e 5 gotas de Teepol[®]). O segundo método teve por base a utilização de uma solução Peróxido de Hidrogénio e detergente (30 % de água oxigenada 160 V e 5 gotas de Teepol[®]).

Para o primeiro método foram tentados os tempos: 15, 25 e 30 min. Para o segundo método foram tentados os tempos: 10, 15 e 20 min..

Findo o tempo de desinfecção, o material era lavado em água destilada estéril, em três passos, com duração de 5 min.. Em seguida, procedia-se à cultura em meio apropriado.

2.2.5. Condições de Esterilização

Todo o material de laboratório utilizado foi esterilizado por autoclavagem (1 atm, 120° C, 30 min.), com a exceção das placas de petri que foram esterilizadas por calor seco, numa estufa de esterilização (180° C durante 1 hora e 30 min.). Todas as manipulações do material vegetal (a partir do momento da desinfecção superficial) foram efectuadas numa câmara de fluxo laminar vertical, sobre caixas de petri estéreis.

Todos os meios utilizados foram esterilizados por autoclavagem (1 atm, 120° C, 20 min.).

As vitaminas foram esterilizadas por filtração por membrana de 0,22 µm (membrana de nitrato de celulose, Sartorius®) e adicionadas aos meios de cultura sob estritas condições de assepsia numa câmara de fluxo laminar.

2.2.6. Condições de Cultura

As culturas foram iniciadas e mantidas numa sala de cultura com condições de temperatura e de luminosidade controladas. Para as culturas de tecido caloso, os recipientes contendo o material vegetal, eram mantidos na mesma sala, mas sob condições de obscuridade. A temperatura era de $22 \pm 1^\circ \text{C}$ e o fotoperíodo de 16 h.

2.2.6.1. Meios de Cultura

a. Escolha dos Meios de Cultura

Foram testados dois meios de cultura *in vitro*: o meio de Gresshoff e Doy (ROMANO, 1994) modificado e com vitaminas de Fossard e Lee (GOMES, 1989), que foi designado por GDMFL, e o de Loyd e McCown (AHUJA, 1984) modificado (menor concentração de cálcio), que foi designado por WPMM (Tabela 2-7).

Em ensaios preliminares, verificou-se que a utilização de um meio “brando” (com menor concentração de agar), favorecia a produção tanto de tecido caloso como de rebentos. A rentabilidade das culturas, praticamente, duplicava quando, em vez de se utilizarem 7 gL^{-1} de agar (testado para culturas de tecidos, Sigma®), se utilizava apenas 6 gL^{-1} .

Na Tabela 2-7, descrevem-se as composições dos meios GDMFL (Gresshoff e Doy modificado e com vitaminas de Fossard e Lee) e WPMM (Loyd e McCown modificado).

Tabela 2-7: Composição dos meios GDMFL e WPMM.

GDFL – Meios de Gresshoff e Doy modificado e com vitaminas de Fossard e Lee) ; WPMM- Meio de Loyd e McCown modificado.

COMPONENTES	GDMFL (mgL ⁻¹) ^a	WPMM (mgL ⁻¹) ^b
MACRONUTRIENTES		
KNO ₃	1000	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	400	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	250	370
CaCl ₂ .2H ₂ O	80 ^c	48 ^c
NH ₄ NO ₃	-	400
KH ₂ PO ₄	300	170
K ₂ SO ₄	-	990
Ca(NO ₃) ₂	-	386 ^c
MICRONUTRIENTES		
MnSO ₄ .H ₂ O	10,00	-
MnSO ₄ .4H ₂ O	-	29,43
H ₃ BO ₃	3,00	6,20
ZnSO ₄ .7H ₂ O	3,00	6,98
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025	0,25
KI	0,83	-
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,25
FONTE DE FERRO		
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,25	37,25
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85	27,85
ADITIVOS		
Mio-inositol	100	100
Glutamina	500	500
Caseína hidrolisada	100	100
VITAMINAS		
Ácido fólico	0,44	-
Riboflavina	0,38	-
Biotina	0,49	-
Cloreto colina	0,14	100
Pantotenato de cálcio	0,48	500
Tiamina-HCl	0,67	-
Nicotianamida	1,46	-
Piridoxina-HCl	0,61	-
AGAR	6000	6000
SACAROSE	20000	20000
pH	5,7	5,7

^a adaptado de GOMES (1989)^b adaptado de ROMANO (1994)^c segundo recomendação de GOMES (1989)

b. Preparação de soluções-mãe e meios de cultura

Foram preparadas soluções-mãe concentradas 20 vezes de macronutrientes, de ferro e de micronutrientes, soluções-mãe de reguladores de crescimento (1 mgL⁻¹) e solução-mãe concentrada 250 vezes de vitaminas. Para evitar a precipitação das soluções após armazenamento, foram preparadas as seguintes soluções-mãe de macronutrientes: solução 1 contendo (NH₄)₂SO₄, MgSO₄.7H₂O e KH₂PO₄; solução 2 contendo KNO₃ e; solução 3, contendo CaCl₂.2H₂O. A solução-mãe de ferro, foi denominada por solução 4, e a de micronutrientes por solução 5. Todas estas soluções (com a exceção das vitaminas) foram armazenadas a 4° C por

períodos de tempo inferiores a três meses. Para a preparação das vitaminas, os componentes foram diluídos em 500 mL de água desionizada, a solução resultante foi filtrada por membrana de 0,22 µm (membrana de nitrato de celulose, Sartorius®) para um frasco estéril. Distribuíram-se alíquotas de 1 mL por microtubos (1,5 mL) estéreis, por pipetagem sob condições assepsia numa câmara de fluxo laminar. Os microtubos assim preparados eram congelados a -20° C e armazenados por períodos de tempo inferiores a 3 meses.

Na altura da preparação dos meios de cultura as soluções eram adicionadas pela ordem do número da solução. Em seguida adicionava-se o mio-inositol, a glutamina e a caseína hidrolisada, que eram pesados na altura. Subsequentemente, eram adicionados os reguladores de crescimento, acertado o pH (com NaOH ou HCl a 0,1 N) e aferido ao volume pretendido. A cada 500 mL de meio eram adicionados a sacarose (½) e o agar (½) e, seguidamente, procedia-se à autoclavagem em frascos de vidro de borossilicato (Schoot®) de capacidade de 1 L. Os frascos eram rolhados, sem apertar, e a autoclavagem do meio era conduzida a 121° C, 1 atm, durante 20 min. Os meios eram deixados a arrefecer num banho termostático até aos 45° C. Na câmara de fluxo laminar, adicionava-se o conteúdo de uma alíquota de vitaminas previamente descongeladas a cada 500 mL de meio de cultura. O meio era agitado e distribuído em placas de petri, frascos de cultura ou tubos de cultura. Finalmente, os recipientes de cultura eram deixados a arrefecer na bancada e armazenados a 4° C até posterior utilização (armazenamento por períodos de tempo inferiores a uma semana).

Os ensaios preliminares mostraram que o crescimento era favorecido quando se utilizavam frascos de vidro rolhados com tampa plástica (frascos D32 ou A728, Marinha Grande) ou tubos em polipropileno de 20 mL em vez de placas de petri ou tubos de ensaio.

Na Tabela 2-8 são descritas, em detalhe, as composições em termos de reguladores de crescimento para os meios de indução e manutenção de tecido caloso (GDMFL-TC ou WPMML-TC), porções aéreas (GDMFL-PA ou WPMML-PA) e de plântulas (GDMFL-IR e GDMFL).

Tabela 2-8: Reguladores de crescimento dos meios otimizados para indução e manutenção dos vários tipos de culturas.
PA – meio para indução e manutenção de porções aéreas; TC – Meio para indução e manutenção de tecido caloso; IR^a – meio para indução de raízes; meio sem reguladores de crescimento – para crescimento das raízes.

Reguladores de crescimento (Solução-mãe: 1 mg.mL ⁻¹)	Meios (GDMFL ou WPMML) (concentração final)		
	PA	TC	IR ^a
BAP (mL)	0,500 (2,22 µM)	0,100 (0,44 µM)	-
IAA (mL)	1,000 (5,71 µM)	-	-
IBA (mL)	-	-	10,000 (49,20 µM)
NAA (mL)	-	1,000 (5,37 µM)	-

^a utilizado apenas no meio GDMFL

2.2.6.2. Tipo de explante e orientação

Para cada meio testaram-se seis tipos de explantes: gomos apicais; gomos axilares; folhas intactas; porções de folhas; segmentos de entrenó e secções longitudinais de segmentos de entrenó.

Optou-se por uma orientação vertical das gemas apicais e gemas axilares e horizontal das folhas intactas, porções de folhas, segmentos de entrenó e secções longitudinais de segmentos de entrenó.

2.2.6.3. Métodos para indução e manutenção de porções aéreas

Para a indução de porções aéreas foram tentadas várias razões entre citocinina e auxina de acordo com a literatura consultada. Os reguladores de crescimento mais recomendados eram a citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e a auxina ácido naftalenacético (NAA). Nos ensaios preliminares, foram tentadas várias proporções entre BAP e NAA, contudo as concentrações recomendadas por ROMANO (1994) foram as que deram resultados melhores. Para obtenção de porções aéreas, foram então utilizados os meios GDMFL e WPMM com a adição de $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de 6-benzilaminopurina (BAP) e 1 mgL^{-1} de ácido indolil-3-acético (IAA). Estes meios foram designados por GDMFL-PA e WPMM-PA, respectivamente, e permitiam a indução e manutenção de um número considerável de porções aéreas em gomos axilares de plantas jovens e adultas.

Para a propagação de porções aéreas de *Q. suber*, *in vitro*, foram escolhidos dois percursos diferentes. Num deles utilizam-se como explantes iniciais, ápices caulinares e no outro utilizam-se gomos axilares. Cada explante tinha um comprimento de 5 a 8 mm. Nos explantes de gomos axilares, cada segmento continha apenas um gomo axilar. Os explantes eram orientados verticalmente, a parte basal fica em contacto com o meio numa profundidade de cerca de 3 mm. Os frascos eram rolhados e colocados numa estufa a $22^\circ \text{C} \pm 1$ e fotoperíodo de 16 horas de dia e 8 horas de noite. No processo de propagação clonal, procedeu-se à regeneração de rebentos desenvolvidos após quatro semanas de crescimento em meio optimizado para porções aéreas. Foram retirados todos os rebentos apicais e axilares, existentes nos segmentos de *Q. suber*, que sofreram todo o processo de crescimento, durante quatro semanas. Estes rebentos excisados foram colocados em novo meio optimizado para porções aéreas, com uma orientação vertical. Após a cultura, os frascos são colocados numa estufa com temperatura de $22^\circ \text{C} \pm 1$ e fotoperíodo de 16 horas de dia e 8 horas de noite, sendo repicados periodicamente de 4 em 4 semanas, para um novo meio nutritivo.

2.2.6.4. Métodos para indução e plântulas

Após a obtenção das porções aéreas foi necessário otimizar um meio de cultura para a indução de raízes para se obterem plântulas. Com tal objectivo foram tentadas várias razões entre reguladores de crescimento de acordo com a literatura consultada. Após múltiplos fracassos, em experiências preliminares, foi possível induzir enraizamento utilizando o método modificado de GONÇALVES e RAINHO (1992).

Para induzir a formação de raízes, utilizaram-se porções aéreas com o mínimo de 3 cm de comprimento, provenientes de meio otimizado para porções aéreas, sendo transferidas para meio otimizado para indução de raízes (GDMFL-IR, Tabela 2-7 e Tabela 2-8), durante 7 dias, sendo colocados numa estufa a $22^{\circ}\text{C} \pm 1$ e com fotoperíodo de 16 horas de dia e 8 horas de noite. Após este período de tempo, as porções aéreas são transferidas para meio otimizado para crescimento de raízes (GDMFL, sem reguladores de crescimento, Tabela 2-7), onde ficam a crescer, durante 4 semanas, nas mesmas condições de cultura descritas anteriormente.

2.2.6.5. Métodos para indução e manutenção de tecido caloso

Para a indução de tecido caloso foram tentadas várias razões entre citocinina e auxina. De acordo com a literatura consultada, os reguladores de crescimento mais recomendados eram a citocinina, 6-benzilaminopurina (BAP), e a auxina, ácido naftalenacético (NAA).

Para a obtenção, da cultura *in vitro*, de tecido caloso de *Q. suber*, foram utilizados os entrenós, provenientes dos cortes feitos nos segmentos provenientes de plantas jovens e adultas. Estes entrenós são colocados no meio de cultura para formação de tecido caloso (GDMFL-TC ou WPMML-TC), numa posição horizontal, de forma a terem uma maior área de contacto com o meio nutritivo. Após o posicionamento dos explantes, os frascos são rolhados e colocados numa estufa a $22^{\circ}\text{C} \pm 1$, sempre sob condições de escuridão. Estes tecidos são repicados, periodicamente de quatro em quatro semanas para um novo meio nutritivo e colocados, novamente, no escuro.

2.2.6.6. Transferência para meio novo

As transferências do material propagado, para meio novo, foram conduzidas todas as 4 semanas.

2.2.7. Recolha e Tratamento de Dados

Para todos os ensaios fizeram-se observações semanais. Os dados apresentados neste capítulo reportam-se às observações feitas à quarta semana de crescimento e foram tratados pela ferramenta informática SPSS 13.0 para ambiente Windows.

Para a avaliação do método de desinfecção compararam-se os dois métodos relativamente a cada um dos tempos, isto é, no primeiro tempo comparou-se o binómio 15 min-10 min. (Hipoclorito de Sódio/Peróxido de Hidrogénio), no segundo tempo o binómio 25 min-15 min. (Hipoclorito de Sódio/Peróxido de Hidrogénio) e no terceiro 30 min-20 min. (Hipoclorito de Sódio/Peróxido de Hidrogénio).

Os gráficos de barras apresentados na avaliação quantitativa da eficácia do método de indução de plântulas (Gráfico 2-1 e Gráfico 2-2) representam as frequências (relativa e exacta, respectivamente) e os desvios padrão associados e foram elaborados recorrendo à ferramenta informática Excel (Versão 2003 para ambiente Windows).

Antes de se realizarem os testes estatístico procedia-se à verificação da normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e à homogeneidade das variâncias (teste de Levene) no sentido de saber se era possível aplicar o teste paramétrico ou o não-paramétrico. É aceite, em geral, que os testes não-paramétricos são menos potentes que os correspondentes testes paramétricos, quando aplicados a amostras de grande dimensão e de dimensão igual entre si (MAROCO, 2003). Contudo os testes não-paramétricos chegam a ser mais robustos para amostras de pequena e diferente dimensão (MAROCO, 2003). No caso da amostra em estudo e em relação à maioria das variáveis ou a amostra não seguia uma distribuição normal, ou não era homogénea ou então era demasiadamente pequena para serem utilizados os testes paramétricos. Por esses motivos os testes aplicados são de natureza não paramétrica.

Os testes estatísticos para a avaliação da eficácia dos meios de cultura e do tipo de explante aplicados foram os testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis (ANOVA em ordem a Kruskal-Wallis) (Tabela 2-11 e Tabela 2-13). Os testes estatísticos para avaliação da eficácia dos métodos de desinfecção superficial do material vegetal foram analisados separadamente para a contaminação, enegrecimento, formação de tecido caloso, formação de porção aérea e formação de raiz, por aplicação do teste não-paramétrico de Wilcoxon [teste do somatório se posições (duas amostras) de Wilcoxon] (Tabela 2-15, Tabela 2-17, Tabela 2-19 e Tabela 2-21). O teste do somatório de posições de Wilcoxon não faz pressupostos de distribuição e é o equivalente não-paramétrico do teste-*t* não emparelhado (PETRIE e SABIN, 2000).

O limite de confiança aceite foi igual ou superior a 95%. Na avaliação do nível de significância o valor de *p* pode ser classificados em quatro grupos: sem significância; com

significância entre 0,05 e 0,01; com significância entre 0,01 e 0,001 e; maior que 0,001. Assim de acordo com o representado na Tabela 2-9 , temos:

Tabela 2-9: Correspondência do nível de significância com o resultado do teste estatístico e com a sinalética utilizada na apresentação de resultados.

Valor de p	Resultado do teste	Comentário	Sinalética
Maior que 0,05	Aceitar a Hipótese Nula (H_0)	Não há evidências para rejeitar H_0	NS
Entre 0,01 e 0,05	Rejeitar H_0 (Aceitar H_1)	Há algumas evidências para rejeitar H_0 (por isso aceitar H_1)	*
Entre 0,001 e 0,01	Rejeitar H_0 (Aceitar H_1)	Há uma forte evidência para rejeitar H_0 (por isso aceitar H_1)	**
Menor que 0,001	Rejeitar H_0 (Aceitar H_1)	Há uma evidência muito forte para rejeitar H_0 (por isso aceitar H_1)	***

Nas tabelas onde são apresentados os testes estatísticos a sinalética “NS” corresponde a não significativo, “*” pouco significativo, “**” significativo e “***” muito significativo.

2.3. RESULTADOS

A indução e a manutenção de culturas *in vitro* de *Quercus suber* foram avaliadas sob o ponto de vista qualitativo e quantitativo. Relativamente à análise quantitativa apresentam-se os resultados relativos aos métodos de desinfecção (tipo de desinfetante e tempo de desinfecção), meio de cultura utilizado e tipo de explante.

2.3.1. Avaliação Qualitativa das Culturas *In Vitro*

Na Fig. 2-4 apresenta-se o desenvolvimento de gomos axilares para produção de porções aéreas em meio GDMFL-PA.

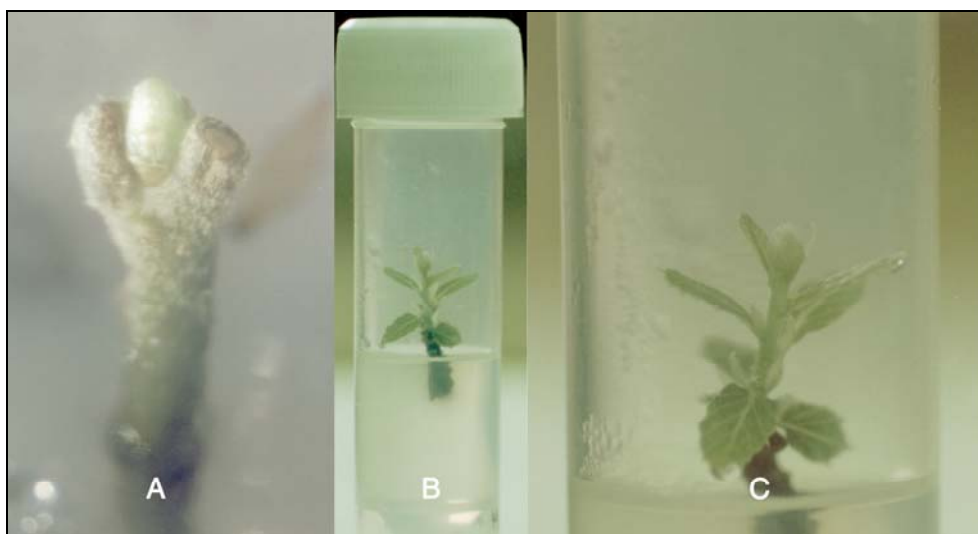


Fig. 2-4: Aspecto da indução de crescimento de gomos axilares. Produção de porções aéreas a partir de gomos axilares em meio GDMFL-PA: A - Aspecto particular do gomo axilar em indução após 1 semana de incubação (30x); B - Aspecto geral da porção aérea induzida ao fim de 4 semanas de incubação; C - *idem* B (10X).

Na Fig. 2-5 apresenta-se o desenvolvimento de gomos axilares para produção de porções aéreas em meio WPMM-PA.

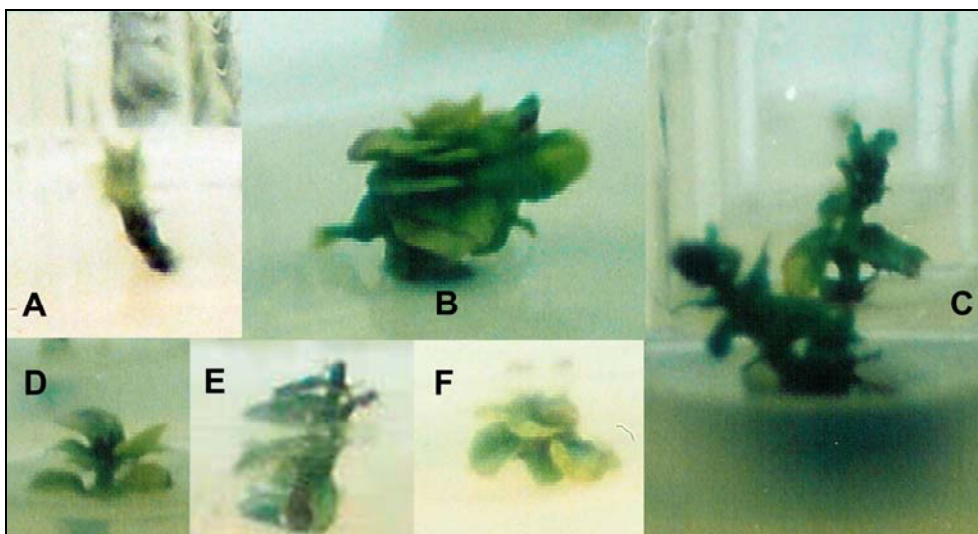


Fig. 2-5: Aspecto da indução de crescimento de gomos axilares. Produção de porções aéreas a partir de gomos axilares em meio WPMM-PA: A - Aspecto particular do gomo axilar em indução após 1 semana de incubação (10x); B a F – Aspecto geral da porção aérea induzida ao fim de 4 semanas de incubação (10X).

O método de desinfecção por Peróxido de Hidrogénio produziu resultados melhores em termos de indução e manutenção de porções aéreas de *Quercus suber in vitro*, os gomos axilares

desenvolviam-se mais rapidamente e sem aparentarem fenómenos de enegrecimento¹⁰ (Fig. 2-4). Também foram obtidos melhores resultados quando foi utilizado o meio de GDMFL-PA alternativamente ao de WPMM-PA (Fig. 2-5).

Como é possível atestar da comparação da Fig. 2-4 com a Fig. 2-5 as porções aéreas provenientes dos meios GDMFL-PA eram mais desenvolvidas e as provenientes de WPMM-PA eram mais compactas, muitas vezes não sendo possível evidenciar devidamente os desnivelamentos entre os nós. No meio de GDMFL-PA as porções aéreas eram mais longas, com folhas bem desenvolvidas.

Na Fig. 2-4 apresenta-se o desenvolvimento de segmentos de entrenó para produção de tecido caloso.

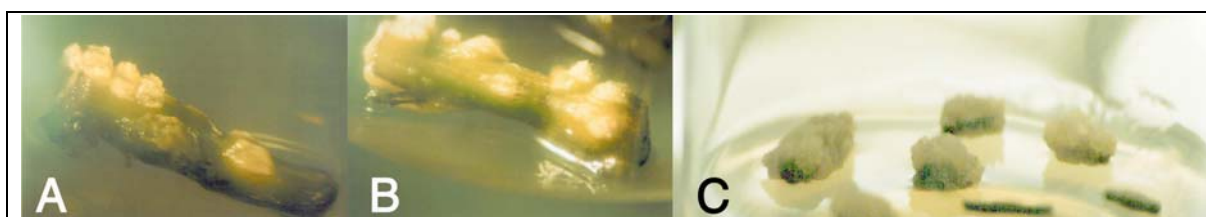


Fig. 2-6: Aspecto do crescimento de tecido caloso em segmentos de entrenó.

Segmentos de entrenó induzidos: A e B – Após 2 semanas de crescimento;

C - Após 4 semanas de crescimento.

Na Fig. 2-6 apresenta-se a indução de tecido caloso. A formação de tecido caloso não divergia muito, quer se tratasse de GDMFL-TC ou WPMM-TC. Após duas semanas de cultura, começavam a notar-se formações nodulares de tecido caloso por cima dos segmentos de entrenó. O tecido assim formado era de um pálido amarelado. Em geral, com o prosseguimento da incubação em condições de obscuridade, estas formações recobriam a totalidade do segmento de entrenó ao fim de 4 semanas de cultura. O tecido resultante era indiferenciado, friável e intrincado. No final deste período o tecido esbranquiçado era cuidadosamente destacado (sob condições de assepsia) do segmento que lhe deu origem e prosseguia o seu crescimento em meio novo.

¹⁰ Fenómenos de enegrecimento: um dos problemas da iniciação das culturas de tecidos das espécies vegetais, e particularmente das espécies lenhosas, é o enegrecimento dos explantes (que frequentemente tomam-se acastanhados ou escurecidos logo após o isolamento, sobretudo nas regiões próximas das extremidades cortadas de fresco), frequentemente, acompanhado pelo enegrecimento do próprio meio de cultura (TOLEDO *et al.*, 1998 e TITOV *et al.*, 2006). Este fenómeno é atribuído à oxidação de compostos fenólicos que são exudados do tecido vegetal (TITOV *et al.*, 2006). A oxidação dos compostos fenólicos (induzida por um aumento da actividade das oxidases dos polifenóis) resulta na formação de quinonas (TITOV *et al.*, 2006) (quinona: anel benzénico contendo dois grupos funcionais cetona). As quinonas são altamente reactivas e tóxicas para os tecidos vegetais [Taji e Williams (1996) citados por TITOV *et al.*, 2006]. A compreensão dos processos que contribuem para a oxidação dos compostos fenólicos e de como a sua produção pode ser minimizada na altura da iniciação dos explantes são críticos para o sucesso da cultura *in vitro* (TITOV *et al.*, 2006). Quando não se controla o processo de oxidação dos compostos fenólicos o crescimento *in vitro* é inibido e, no limite, o tecido morre (TOLEDO *et al.*, 1998). Genericamente, pode-se afirmar que os tecidos jovens são menos susceptíveis ao enegrecimento do que os maduros (TOLEDO *et al.*, 1998). Neste capítulo optou-se pela utilização da palavra enegrecimento (em detrimento da palavra escurecimento) para expressar a alteração de cor provocada pelo corte e desinfecção superficial do material vegetal que inicia as culturas *in vitro*. Por outro lado, a palavra escurecimento foi utilizada, nos capítulos 4 e 5 para definir a alteração de cor provocada nos tecidos vegetais em consequência da interacção *in vitro* com o agente infeccioso *P. cinnamomi*.

Na Fig. 2-7 apresenta-se o desenvolvimento de raízes após indução em rebentos com cerca de 3 cm de comprimento em meio de enraizamento (GDMFL-IR, Tabela 2-7 e Tabela 2-8) e posterior crescimento em meio desprovido de reguladores de crescimento (GDMFL, Tabela 2-7).



Fig. 2-7: Aspecto do enraizamento de *Q. suber*.

Os ápices, depois de induzidos em meio GDMFL-IR, foram colocados em meio GDMFL: A – Vista da distribuição radial das raízes; B – Vista da distribuição em profundidade das raízes no meio de cultura.

Após a incubação das porções aéreas em GDMFL-IR durante 7 dias não se observavam alterações aparentes nas bases dos mesmos. Assim que eram colocados em GDMFL (sem reguladores de crescimento) e, quase sempre invariavelmente ao fim de sete dias, começavam a aparecer os primeiros nódulos radiculares nas bases das porções aéreas. As raízes apresentam um aspecto branco-amarelado, eram vigorosas e desenvolviam-se atravessando o meio de cultura em profundidade.

2.3.2. Avaliação Quantitativa da Eficácia dos Meios de Cultura Utilizados

Para a avaliação da eficácia dos meios de cultura foram utilizados 662 explantes, aos quais foi empregue o meio GDMFL (Meio de cultura de Gresshoff e Doy modificado com vitaminas de Fossard e Lee), e 242 explantes, aos quais foi empregue o meio WPM (Meio de cultura de Lloyd e McCown modificado). Na Tabela 2-10 apresentam-se as percentagens relativas de Enegrecimento, Formação de tecido caloso, Formação de parte aérea e Formação directa de raiz ao fim de 28 dias de incubação.

Tabela 2-10: Percentagens relativas de Enegrecimento, Formação de tecido caloso, Formação de parte aérea e Formação directa de raiz nos meios GDMFL e WPMM.

Ao fim de 28 dias de cultura em: GDMFL – Meio de cultura de Gresshoff e Doy modificado com vitaminas de Fossard e Lee; ou WPMM – Meio de cultura de Lloyd e McCown modificado.

Parâmetros Observados no 28º dia		Meio de Cultura				Total	
		GDMFL		WPMM			
		N	%	N	%	N	%
Enegrecimento	Negativa	576	87,0%	173	71,5%	749	82,9%
	Positiva	86	13,0%	69	28,5%	155	17,1%
Formação de tecido caloso	Negativa	313	47,3%	118	48,8%	431	47,7%
	Positiva	349	52,7%	124	51,2%	473	52,3%
Formação de parte aérea	Negativa	501	75,7%	218	90,1%	719	79,5%
	Positiva	161	24,3%	24	9,9%	185	20,5%
Formação directa de raiz	Positiva	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
	Negativa	662	100,0%	242	100,0%	904	100,0%
Total		662	100,0%	242	100,0%	904	100,0%

Da leitura da tabela anterior é possível inferir que a percentagem de Enegrecimento ao fim de 28 dias de crescimento foi menor quando foi empregue o meio de cultura GDMFL (13,0%) do que quando foi empregue o meio de cultura WPMM (28,5%). A percentagem de formação de tecido caloso ao fim de 28 dias de crescimento foi sensivelmente semelhante para os dois meios de cultura (GDMFL 52,7% e WPMM 51,2%). A formação de porção aérea foi superior quando foi utilizado o meio GDMFL (24,3%) do que quando foi utilizado o meio WPMM (9,9%). Tanto no meio GDMFL como WPMM não foi registado qualquer caso de formação directa de raiz.

Para testar a eficácia dos meios de cultura foi utilizado o Teste de Kruskal-Wallis não-paramétrico (uma vez que as amostras ou não possuíam uma distribuição normal, ou não eram homogéneas) entre os grupos Meio de cultura GDMFL (Meio de cultura de Gresshoff e Doy modificado com vitaminas de Fossard e Lee) e WPMM (Meio de cultura de Lloyd e McCown modificado) *versus* Enegrecimento, Formação de tecido caloso e Formação de parte aérea ao fim de 28 dias de incubação (intervalo de confiança de 95%).

Tabela 2-11: Teste de Kruskal-Wallis não-paramétrico entre o Tipo de Meio (GDMFL e WPMM) e o Enegrecimento, Formação de Tecido caloso e Formação de Porção Aérea.

Ao fim de 28 dias de cultura em: GDMFL – Meio de cultura de Gresshoff e Doy modificado com vitaminas de Fossard e Lee; ou WPMM – Meio de cultura de Lloyd e McCown modificado (intervalo de confiança de 95%).^{a,b}

Tipo de Meio (GDMFL e WPMM)	Enegrecimento no 28º dia	Formação de tecido caloso no 28º dia	Formação de parte aérea no 28º dia
Qui-quadrado	30,020	0,155	22,561
GL	1	1	1
Sig. assintótica	0,000***	0,694 ^{NS}	0,000***

^a Prova de Kruskal-Wallis (Teste Não-paramétrico)

^b Variável de agrupamento: Meio de Cultura

Da análise da Tabela 2-11 é possível inferir que, os resultados obtidos para a Enegrecimento e para a formação de parte aérea nos dois meios de cultura são significativamente diferentes ($p < 0,001$), enquanto que os resultados obtidos para a variável formação de tecido caloso nos dois meios de cultura não são ($p > 0,05$).

2.3.3. Avaliação Quantitativa da Eficácia do Tipo de Explante Utilizado

Para a avaliação da eficácia do tipo de explante utilizaram-se um total de 899 explantes, dos quais 54 eram de ápice caulinar, 393 de gomo axilar, 92 de segmento de entrenó, 60 de segmento de entrenó cortado em duas secções longitudinais, 175 de porção de folha, 101 de folha intacta e 12 de folha madura intacta (Tabela 2-12).

Dos 899 explantes 15,0% (n=135) contaminaram¹¹, 16,9% (n=152) enegreceram, 52,3% (n=470) formaram tecido caloso e 20,5% (n=184) formaram porção aérea. De um total de 54 ápices caulinares 33,3% (n=18) contaminaram, 22,2% (n=12) enegreceram, 42,6% (n=23) formaram tecido caloso e 29,6% (n=16) formaram porção aérea. Dos 393 gomos axilares 21,1% (n=83) contaminaram, 20,9% (n=82) enegreceram, 49,1% (n=193) formaram tecido caloso e 40,7% (n=160) formaram porção aérea. De um total de 92 Segmento de entrenó 8,7% (n=8) contaminaram, 21,7% (n=20) enegreceram, 63,0% (n=58) formaram tecido caloso e 7,6% (n=7) formaram porção aérea. Dos 60 Segmento de entrenó cortados em duas secções longitudinais 18,3% (n=11) contaminaram, 15,0% (n=9) enegreceram, 58,3% (n=35) formaram tecido caloso e 1,7% (n=1) formaram porção aérea. De um total de 175 Porções de folhas jovens 5,1% (n=9) contaminaram, 12,0% (n=21) enegreceram, 59,4% (n=104) formaram tecido caloso e nenhum formou porção aérea. Das 101 folhas jovens intactas 5,0% (n=5) contaminaram, 6,9% (n=7) enegreceram, 51,5% (n=52) formaram tecido caloso e nenhuma formou porção aérea. De um total de 12 porções de folhas maduras 8,3% (n=1) contaminaram, 8,3% (n=1) enegreceram, nenhuma formou tecido caloso ou porção aérea. Das 12 folhas maduras intactas nenhuma contaminou ou enegreceu e 41,7% (n=5) formaram tecido caloso.

¹¹ Contaminação: os contaminantes das culturas *in vitro* podem ser biológicos ou químicos, intrínsecos ou extrínsecos, detectáveis ou indetectáveis, destrutivos ou aparentemente benignos, mas, em qualquer dos casos, afectam adversamente a cultura e, conseqüentemente, a qualidade da(s) pesquisa(s) subsequente(s). Neste estudo o termo é utilizado para expressar a contaminação biológica detectável (designadamente por bactérias, bolores e leveduras) ao 28º dia de cultura que ocorre mesmo após a desinfecção superficial dos tecidos usados para iniciar as culturas *in vitro*.

Tabela 2-12: Percentagens relativas de Contaminação, Enegrecimento, Formação de tecido caloso, Formação de parte aérea e Formação directa de raiz ao fim de 28 dias de incubação em função do tipo de explante experimentado.

Tipo de explante		Contaminação no 28º dia		Enegrecimento no 28º dia		Formação de tecido caloso no 28º dia		Formação de parte aérea no 28º dia		Formação directa de raiz no 28º dia	Total
		Negativa	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa	
Ápice	N	36	18	42	12	31	23	38	16	54	54
	%	66,7%	33,3%	77,8%	22,2%	57,4%	42,6%	70,4%	29,6%	100,0%	100,0%
Gomo axilar	N	310	83	311	82	200	193	233	160	393	393
	%	78,9%	21,1%	79,1%	20,9%	50,9%	49,1%	59,3%	40,7%	100,0%	100,0%
Segmento de entrenó	N	84	8	72	20	34	58	85	7	92	92
	%	91,3%	8,7%	78,3%	21,7%	37,0%	63,0%	92,4%	7,6%	100,0%	100,0%
Segmento de entrenó cortado em duas secções longitudinais	N	49	11	51	9	25	35	59	1	60	60
	%	81,7%	18,3%	85,0%	15,0%	41,7%	58,3%	98,3%	1,7%	100,0%	100,0%
Porção de folha jovem	N	166	9	154	21	71	104	175	0	175	175
	%	94,9%	5,1%	88,0%	12,0%	40,6%	59,4%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%
Folha jovem intacta	N	96	5	94	7	49	52	101	0	101	101
	%	95,0%	5,0%	93,1%	6,9%	48,5%	51,5%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%
Porção de folha madura	N	11	1	11	1	12	0	12	0	12	12
	%	91,7%	8,3%	91,7%	8,3%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%
Folha madura intacta	N	12	0	12	0	7	5	12	0	12	12
	%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	58,3%	41,7%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%
Total	N	764	135	747	152	429	470	715	184	899	899
	%	85,0%	15,0%	83,1%	16,9%	47,7%	52,3%	79,5%	20,5%	100,0%	100,0%

Do ponto de vista da contaminação os ápices caulinares são aqueles que mais frequentemente contaminavam, enquanto que as folhas e os segmentos de entrenó são aqueles que apresentavam menores taxas de contaminação. Para a Enegrecimento, as folhas apresentavam menores taxas e os ápices caulinares e gomos axilares maiores taxas. Os segmentos de entrenó (intactos os segmentados longitudinalmente) e as folhas (jovens) são os explantes que contribuíam com maior produção de tecido caloso. Para a produção de parte aérea o maior contributo é dado pelos gomos axilares, seguidos dos ápices. Nenhum explante de folha produziu parte aérea. É importante salientar que dos 899 explantes experimentados, nenhum produziu, de forma directa, raiz.

Uma vez que as amostras não possuíam uma distribuição normal nem as variâncias eram homogéneas, isto é, por aplicação dos testes de verificação da normalidade (Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk) p era inferior a 0,05 e de homogeneidade da variância (Levene) p era inferior a 0,05, recorreu-se aos testes de Kruskal-Wallis não-paramétricos para provar a eficácia do tipo de

explante em função da contaminação, Enegrecimento, formação de tecido caloso e formação de parte aérea ao fim de 28 dias de incubação (intervalo de confiança de 95%).

Tabela 2-13: Teste de Kruskal-Wallis não-paramétrico entre os grupos tipo de explante *versus* Contaminação, Enegrecimento, Formação de tecido caloso e Formação de parte aérea ao fim de 28 dias de incubação (intervalo de confiança de 95%).^{a,b}

Tipo de explante	Contaminação no 28º dia	Enegrecimento no 28º dia	Formação de tecido caloso no 28º dia	Formação de parte aérea no 28º dia
Qui-quadrado	49,529	16,934	12,126	190,895
GL	5	5	5	5
Sig. assintótica	0,000***	0,005**	0,033*	0,000***

^a Prova de Kruskal-Wallis (Teste Não-paramétrico)

^b Variável de agrupamento: Meio de Explante

Da análise da Tabela 2-13 é possível inferir que, os resultados obtidos para a Contaminação e Formação de parte aérea são estatisticamente muito significativos ($p < 0,001$). No que respeita ao Enegrecimento as diferenças encontradas entre os vários tipos de explantes que são estatisticamente significativas ($p < 0,01$). Para a formação de tecido caloso as diferenças encontradas entre os vários tipos de explantes que são estatisticamente pouco significativas ($p < 0,05$).

2.3.5. Avaliação Quantitativa da Eficácia dos Métodos de Desinfecção Superficial do Material Vegetal

Para a avaliação da eficácia dos métodos de desinfecção superficial foram utilizados 388 explantes, aos quais foi empregue o método de 1 (Hipoclorito de Sódio), e 516 explantes, aos quais foi empregue o método 2 (Peróxido de Hidrogénio).

2.3.5.1. Contaminação

Foram comparadas as frequências relativas de resultados positivos e negativos de contaminação no 28º dia de cultura dos explantes, nos três tempos de exposição, utilizando os dois métodos de desinfecção de superfície (Hipoclorito de Sódio e Peróxido de Hidrogénio) (Tabela 2-14).

Tabela 2-14: Percentagem de contaminação ao fim de 28 dias de cultura dos explantes utilizando dois métodos de desinfecção de superfície e três tempos de exposição.

Metodologia de desinfecção de superfície dos explantes			Contaminação no 28º dia	
			Negativa	Positiva
1º Tempo	Tipo de desinfectante	Hipoclorito de Sódio	24,4%	75,6%
		Peróxido de Hidrogénio	88,8%	11,3%
	Total		66,9%	33,1%
2º Tempo	Tipo de desinfectante	Hipoclorito de Sódio	17,4%	82,6%
		Peróxido de Hidrogénio	94,6%	5,4%
	Total		78,6%	21,4%
3º Tempo	Tipo de desinfectante	Hipoclorito de Sódio	100,0%	0,0%
		Peróxido de Hidrogénio	97,6%	2,4%
	Total		99,4%	0,6%

Da análise da tabela anterior é possível deduzir que, com o aumento da exposição, o método de desinfecção pelo Hipoclorito de Sódio apresentou quase sempre os piores resultados de contaminação (75,6%, 82,6% e 0,0%) comparativamente ao método pelo Peróxido de Hidrogénio (11,3%, 5,4% e 2,4%).

Na Tabela 2-15 estão representados os resultados para o teste de Wilcoxon (teste não-paramétrico para amostras emparelhadas) relativamente à contaminação comparando-se os dois métodos de desinfecção de superfície (Hipoclorito de Sódio e Peróxido de Hidrogénio) e quando foram utilizados três tempos de exposição.

Tabela 2-15: Teste de Wilcoxon para a contaminação por comparação dos dois métodos de desinfecção de superfície (Hipoclorito de Sódio e Peróxido de Hidrogénio), quando foram utilizados três tempos de exposição.

Tempo de Desinfecção	N	Contaminação no 28º dia – Tipo de desinfectante	
1º Tempo	121	Z	-8,797
		Sig. Assimptótica (bilateral)	0,000***
2º Tempo	443	Z	-18,385
		Sig. Assimptótica (bilateral)	0,000***
3º Tempo	340	Z	-16,867
		Sig. Assimptótica (bilateral)	0,000***

Na tabela anterior é possível verificar que, quando comparados os dois métodos de desinfecção, para cada tempo de exposição, são sempre significativamente muito diferentes ($p < 0,001$).

2.3.5.2. Enegrecimento

Foram comparadas as frequências relativas de resultados positivos e negativos de enegrecimento no 28º dia de cultura dos explantes, nos três tempos de exposição, utilizando os dois métodos de desinfecção de superfície (Hipoclorito de Sódio e Peróxido de Hidrogénio).

Tabela 2-16: Percentagem de Enegrecimento ao fim de 28 dias de cultura dos explantes utilizando dois métodos de desinfecção de superfície e três tempos de exposição.

Metodologia de desinfecção de superfície dos explantes			Enegrecimento no 28º dia	
			Negativa	Positiva
1º Tempo	Tipo de desinfectante	Hipoclorito de Sódio	63,4%	36,6%
		Peróxido de Hidrogénio	97,5%	2,5%
		Total	86,0%	14,0%
2º Tempo	Tipo de desinfectante	Hipoclorito de Sódio	43,5%	56,5%
		Peróxido de Hidrogénio	96,3%	3,7%
		Total	85,3%	14,7%
3º Tempo	Tipo de desinfectante	Hipoclorito de Sódio	74,9%	25,1%
		Peróxido de Hidrogénio	89,4%	10,6%
		Total	78,5%	21,5%

Da análise da Tabela 2-16 é possível compreender que o método de desinfecção pelo Hipoclorito de Sódio, nos três tempos de exposição, apresentou sempre piores taxas de enegrecimento (36,6%, 56,5% e 25,1%) comparativamente ao método pelo Peróxido de Hidrogénio (2,5%, 3,7% e 10,6%).

Na Tabela 2-17 estão representados os resultados para o teste de Wilcoxon (teste não-paramétrico para amostras emparelhadas) relativamente ao enegrecimento comparando-se os dois métodos de desinfecção de superfície (Hipoclorito de Sódio e Peróxido de Hidrogénio) e quando foram utilizados três tempos de exposição.

Tabela 2-17: Teste de Wilcoxon para o enegrecimento por comparação dos dois métodos de desinfecção de superfície (Hipoclorito de Sódio e Peróxido de Hidrogénio), quando foram utilizados três tempos de exposição.

Tempo de Desinfecção	N	Enegrecimento no 28º dia – Tipo de desinfectante	
1º Tempo	121	Z	-9,435
		Sig Assimptótica (bilateral)	0,000***
2º Tempo	443	Z	-18,713
		Sig. Assimptótica (bilateral)	0,000***
3º Tempo	340	Z	-15,117
		Sig. Assimptótica (bilateral)	0,000***

Na tabela anterior é possível examinar que, quando comparados os dois métodos de desinfecção, para cada tempo de exposição, são sempre significativamente diferentes ($p < 0,001$).

2.3.5.3. Formação de Tecido Caloso

Foram comparadas as frequências relativas de resultados positivos e negativos de formação de tecido caloso ao 28º de culturas dos explantes, nos três tempos de exposição, utilizando os dois métodos de desinfecção de superfície (Hipoclorito de Sódio e Peróxido de Hidrogénio).

Tabela 2-18: Percentagem de formação de tecido caloso ao fim de 28 dias de cultura dos explantes utilizando dois métodos de desinfecção de superfície e três tempos de exposição.

Metodologia de desinfecção de superfície dos explantes			Formação de Tecido Caloso no 28º dia	
			Negativa	Positiva
1º Tempo	Tipo de desinfectante	Hipoclorito de Sódio	82,9%	17,1%
		Peróxido de Hidrogénio	28,8%	71,3%
	Total		47,1%	52,9%
2º Tempo	Tipo de desinfectante	Hipoclorito de Sódio	83,7%	16,3%
		Peróxido de Hidrogénio	39,0%	61,0%
	Total		48,3%	51,7%
3º Tempo	Tipo de desinfectante	Hipoclorito de Sódio	41,2%	58,8%
		Peróxido de Hidrogénio	64,7%	35,3%
	Total		47,1%	52,9%

Da análise da Tabela 2-18 é possível perceber que o método de desinfecção pelo Hipoclorito de Sódio, nos três tempos de exposição, apresentou sempre menores taxas de formação de tecido caloso (17,1%, 16,3% e 58,8%) comparativamente ao método pelo Peróxido de Hidrogénio (71,3%, 61,0% e 35,3%).

Na Tabela 2-19 estão representados os resultados para o teste de Wilcoxon (teste não-paramétrico para amostras emparelhadas) relativamente à formação de tecido caloso comparando-se os dois métodos de desinfecção de superfície (Hipoclorito de Sódio e Peróxido de Hidrogénio) e quando foram utilizados três tempos de exposição.

Tabela 2-19: Teste de Wilcoxon para a formação de tecido caloso por comparação dos dois métodos de desinfecção de superfície (Hipoclorito de Sódio e Peróxido de Hidrogénio), quando foram utilizados três tempos de exposição.

Tempo de Desinfecção	N	Formação de tecido calosos no 28º dia	
		Tipo de desinfectante	
1º Tempo	121	Z	-9,921
		Sig. Assimptótica (bilateral)	0,000***
2º Tempo	443	Z	-18,708
		Sig. Assimptótica (bilateral)	0,000***
3º Tempo	340	Z	-12,565
		Sig. Assimptótica (bilateral)	0,000***

Na tabela anterior é possível apurar que, quando comparados os dois métodos de desinfecção, para cada tempo de exposição, as taxas de formação de tecido caloso são sempre significativamente muito diferentes ($p < 0,001$).

2.3.5.4. Formação de Porção Aérea

Foram comparadas as frequências relativas de resultados positivos e negativos de formação de porção aérea ao 28º de culturas dos explantes, nos três tempos de exposição, utilizando os dois métodos de desinfecção de superfície (Hipoclorito de Sódio e Peróxido de Hidrogénio).

Tabela 2-20: Percentagem de formação de porção aérea ao fim de 28 dias de cultura dos explantes utilizando dois métodos de desinfecção de superfície e três tempos de exposição.

Metodologia de desinfecção de superfície dos explantes			Formação de Porção Aérea no 28º dia	
			Negativa	Positiva
1º Tempo	Tipo de desinfectante	Hipoclorito de Sódio	97,6%	2,4%
		Peróxido de Hidrogénio	100,0%	0,0%
	Total		99,2%	0,8%
2º Tempo	Tipo de desinfectante	Hipoclorito de Sódio	100,0%	0,0%
		Peróxido de Hidrogénio	68,1%	31,9%
	Total		74,7%	25,3%
3º Tempo	Tipo de desinfectante	Hipoclorito de Sódio	88,2%	11,8%
		Peróxido de Hidrogénio	50,6%	49,4%
	Total		78,8%	21,2%

Da análise da Tabela 2-20 é possível apurar que o método de desinfecção pelo Hipoclorito de Sódio, nos três tempos de exposição, apresentou quase sempre menores taxas de formação de porção aérea (2,4%, 0,0% e 11,8%) comparativamente ao método pelo Peróxido de Hidrogénio (0,0%, 31,9% e 49,4%).

Na Tabela 2-21 estão representados os resultados para o teste de Wilcoxon (teste não-paramétrico para amostras emparelhadas) relativamente à formação de porção aérea comparando-se os dois métodos de desinfecção de superfície (Hipoclorito de Sódio e Peróxido de Hidrogénio) e quando foram utilizados três tempos de exposição.

Tabela 2-21: Teste de Wilcoxon para a formação de porção aérea caloso por comparação dos dois métodos de desinfecção de superfície (Hipoclorito de Sódio e Peróxido de Hidrogénio), quando foram utilizados três tempos de exposição.

Tempo de Desinfecção	N	Formação de tecido calosos no 28º dia	
		Tipo de desinfectante	
1º Tempo	121	Z	-9,924
		Sig. Assimptótica (bilateral)	0,000***
2º Tempo	443	Z	-18,805
		Sig. Assimptótica (bilateral)	0,000***
3º Tempo	340	Z	-16,588
		Sig. Assimptótica (bilateral)	0,000***

Na tabela anterior é possível aferir que no primeiro tempo ambos os métodos sejam ineficazes na formação de porção aérea as diferenças encontradas são estaticamente muito significativas, o mesmo acontecendo para os 2º e 3º tempos ($p < 0,001$).

2.3.5.4. Formação de Raiz

A indução de formação de raiz, directamente, a partir de explantes tratados com os dois métodos de desinfecção superficial e incubados tanto no meio GDMFL e WPMM, não foi conseguida. A produção de raízes só era conseguida de forma indirecta utilizando o método de GONÇALVES e RAINHO (1992) em porções aéreas mantidas e subcultivadas¹² *in vitro*, com cerca de 3 cm de comprimento.

2.3.4. Avaliação Quantitativa da Eficácia do Método para Indução de Plântulas

Como é fácil deduzir em nenhuma cultura de indução porções aéreas ou de tecido caloso foram obtidas, de forma directa, raízes. A rizogénese nos tecidos *in vitro* de *Quercus suber* provou

¹² Subcultura: Entrada existente no Dicionário Priberam (online) onde a palavra subcultura tem como segundo significado, com aplicação na Biologia, cultura de microrganismos derivada de outra cultura. Neste estudo o termo exprime a cultura de tecido vegetal derivada de outra cultura (<http://www.priberam.pt>, capturado em 22-08-2006).

ser de difícil consecução, tendo sido aplicados vários métodos, sem êxito. Por último foi tentado o método de GONÇALVES e RAINHO (1992). No Gráfico 2-1 apresenta-se a percentagem de enraizamento obtidas para este método.

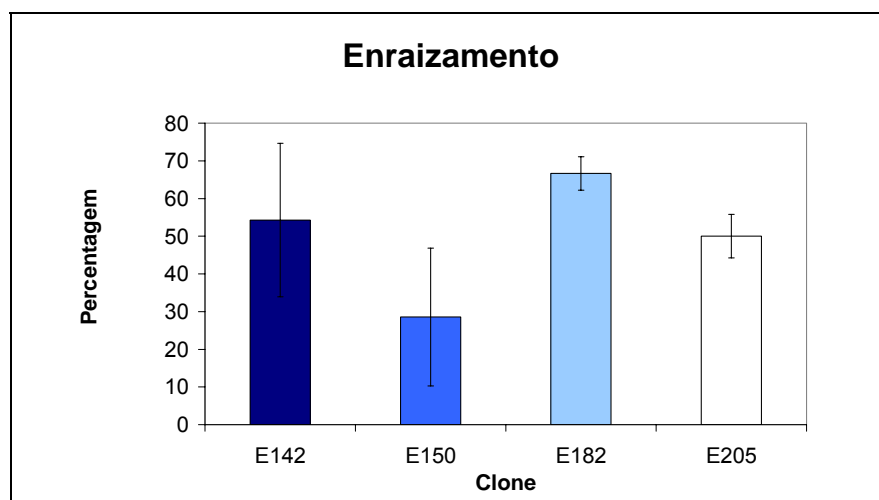


Gráfico 2-1: Percentagem de enraizamento a fim de 7 dias de crescimento. As barras de erro representam o valor da média somando e subtraindo do valor do desvio padrão ($\bar{x} \pm DP$).

O enraizamento foi tentado em quatro explantes com elevado índice de regeneração de porções aéreas. Após aplicação do método de GONÇALVES e RAINHO (1992), e ao fim de uma semana a percentagem de enraizamento registada foi de 54,29, 28,57, 66,67 e 50,00 para os clones E142, E150, E182, E205, respectivamente.

No Gráfico 2-2 apresenta-se o número médio de raízes por explante para cada um dos clones onde foi tentado o enraizamento.

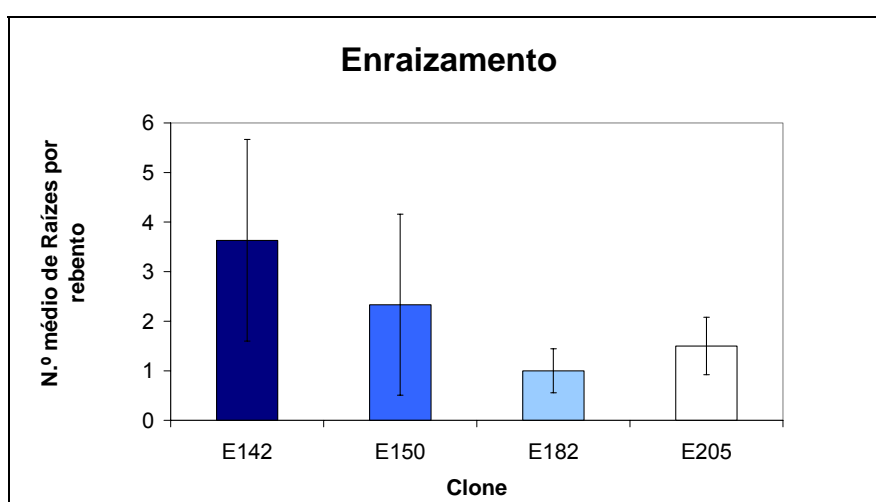


Gráfico 2-2: Número médio de raízes por rebento ao fim de 7 dias de crescimento. As barras de erro representam o valor da média somando e subtraindo do valor do desvio padrão ($\bar{x} \pm DP$).

Nos quatro clones onde foi tentado o enraizamento registou-se que aquele que possuía um maior número de raízes era o clone E142 e o que possuía um menor número de raízes era o E182.

2.4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Verificou-se que a utilização de um meio “brando”, favorecia a produção tanto de TC como de PA. A rentabilidade das culturas, praticamente, duplicava quando em vez de se utilizarem 7 gL⁻¹ de agar (SIGMA® – testado para culturas de tecidos), se utilizava apenas 6 gL⁻¹.

Para produção de porções aéreas o meio de cultura que melhor respondeu foi o de GDMFL (GDMFL 24,3% e WPMM 9,9%, $p < 0,001$) e para produção de tecido caloso não se encontraram diferenças estatisticamente significativas (GDMFL 52,7% e WPMM 51,2%, $p = 0,694$). No que diz respeito ao enegrecimento o meio de cultura que melhor respondeu foi o de GD (GDMFL 13,0% e WPMM 28,5%, $p < 0,001$). A formação de raiz ao fim de 28 dias de cultura não foi registada nem em GDMFL nem em WPMM.

Estabelecer paralelismos entre estes resultados e os de outros autores é delicado uma vez que as várias fontes bibliográficas apresentam meios de composição muito variada. Alguns apresentam os mesmos meios, mas com a introdução de pequenas modificações (na composição mineral ou na composição dos suplementos) que podem contribuir de forma dramática para resultados discrepantes. De uma forma geral pode dizer-se que estes resultados estão de acordo com os de GOMES (1989) que indicava o meio GDMFL como o melhor meio de cultura. Relativamente a ROMANO (1994), que não registou diferenças assinaláveis entre o meio WPM e GD (mas que verificou que estes meios eram substancialmente melhores que o meio de MS), os resultados deste estudo mostraram-se divergentes. No corrente estudo verificaram-se diferenças estatisticamente muito significativas entre o meio de GDMFL e o meio de WPMM para o enegrecimento e a formação de tecido caloso, enquanto que para a formação de tecido caloso não se registaram diferenças significativas.

De uma amostra de 899 explantes, 15% contaminaram ao fim de 28 dias de cultura, 16,9% enegreceram, 52,3% formaram tecido caloso, 20,5% formaram porção aérea e nenhum formou raiz. Do ponto de vista dos tecidos originais, os que mais contaminaram foram os ápices e os gomos axilares (com percentagens de contaminação superiores a 20%), seguidos dos segmentos de entrenó cortados longitudinalmente (18,3%) e os que menos contaminaram foram os segmentos de entrenó intactos, as folhas jovens (intactas ou segmentadas), as folhas maduras (intactas ou segmentadas) (com percentagens de contaminação inferiores a 10%). Com efeito, dada a natureza intrincada dos ápices e dos gomos axilares que possuem zonas de difícil

exposição aos agentes desinfectantes tornam-nos mais sujeitos a contaminações pós inoculação) (DODDS e ROBERTS, 1986). As diferenças nas taxas de contaminação dos tecidos originais revelaram ser estatisticamente muito significativas ($p < 0,001$). Os tecidos originais que mais enegreceram foram os ápices, os gomos axilares e os segmentos de entrenó (com percentagens de enegrecimento superiores a 20%), seguidos dos segmentos de entrenó cortados longitudinalmente, e porções de folha jovem (10-20%) e os que menos enegreceram foram as folhas jovens intactas, as porções de folhas maduras e as folhas maduras intactas (com percentagens de contaminação inferiores a 10%). As diferenças nas taxas de enegrecimento dos tecidos originais revelaram ser estatisticamente significativas ($p < 0,01$). Os tecidos originais que mais formaram tecido caloso foram os segmentos de entrenó (intactos ou segmentados) e as folhas jovens (intactas ou segmentadas) (com percentagens de formação de tecido caloso superiores a 50%), seguidos dos ápices, os gomos axilares e folhas maduras intactas (40-50%) e as folhas maduras segmentadas não produziram tecido caloso. As diferenças nas taxas de formação de tecido caloso dos tecidos originais revelaram ser estatisticamente pouco significativas ($p < 0,05$). Os tecidos originais que mais formaram porções aéreas foram os gomos axilares (40,7%), seguidos dos ápices (29,6%); os segmentos de entrenó (intactos ou segmentados) ocasionalmente formavam porções aéreas (1-10%); as folhas jovens e maduras (intactas ou segmentadas) nunca formavam porções aéreas. As diferenças nas taxas de formação de porções aéreas dos tecidos originais revelaram ser estatisticamente muito significativas ($p < 0,001$). Nenhum tipo de explante produziu directamente raízes (este desidrato só era atingidos quando aplicado o método indirecto de GONÇALVES e RAINHO, 1992 em porções aéreas subcultivadas *in vitro*).

Neste estudo propõe-se uma nova abordagem de desinfecção para *Quercus suber*, e ao que se saiba este é o primeiro registo da aplicação de Peróxido de Hidrogénio como agente desinfectante para a iniciação de culturas *in vitro* desta espécie. Relativamente aos métodos de desinfecção pode dizer-se, de uma forma geral, que o aumento dos tempos de exposição com ambos os agentes melhorava a condição sanitária dos explantes, enquanto que piorava os sinais de enegrecimento. No método do Peróxido de Hidrogénio o aumento da exposição diminuía a formação de tecido caloso e aumentava a produção de porção aérea, enquanto no método do hipoclorito aumentava a formação de tecido caloso e a produção de porção aérea era mantida a um nível baixo.

Do ponto de vista qualitativo e quantitativo o método de desinfecção por Peróxido de Hidrogénio produziu os resultados melhores em termos de indução e manutenção de porções aéreas e de tecido caloso de *Quercus suber in vitro* ($p < 0,001$). Os gomos axilares desenvolviam-se mais rapidamente e quase sem aparentarem fenómenos de enegrecimento. Nos três tempos utilizados com peróxidos de hidrogénio verificou-se que eram necessários períodos menores para se obterem resultados de desinfecção substancialmente melhores (o tempo menor, 10 min., revelou uma contaminação de apenas 11,3%, enquanto que no método do Hipoclorito de

Sódio o menor tempo, 15 min., revelou uma infecção de 75,6%) ($p < 0,001$). Relativamente ao enegrecimento a utilização de Peróxido de Hidrogénio em detrimento do Hipoclorito de Sódio provou ser igualmente melhor (no menor tempo quando foi utilizado o primeiro método o enegrecimento foi de 2,5%, enquanto que no segundo foi de 36,6%) ($p < 0,001$). No que se refere à formação de tecido caloso o método de desinfecção por peróxido, apesar de se mostrar tendencialmente tóxico com o aumento do período de exposição, apresentou quase sempre melhores resultados (no menor tempo quando foi utilizado o primeiro método a formação de tecido caloso foi de 71,3%, enquanto que no segundo foi de 17,1%) ($p < 0,001$). Para a formação de porções aéreas o Peróxido de Hidrogénio mostrou quase sempre ser melhor que o Hipoclorito de Sódio (no menor tempo de desinfecção para estes dois desinfectantes a percentagem foi sensivelmente igual a zero e no segundo tempo, o primeiro método revelou uma percentagem de 31,9% e o segundo de 11,8%) ($p < 0,001$). Para nenhum método foi registada a indução directa de raiz. Os resultados obtidos para a desinfecção com Peróxido de Hidrogénio são substancialmente melhores dos registados na bibliografia consultada. Assim, ROMANO (1994) apresentou eficiências de desinfecção pouco superiores a 50% com o método etanol (70% v/v) durante 1 min., seguido, hipoclorito de cálcio (10% p/v) durante 15 min.. GONÇALVES e RAINHO obtiveram taxas de desinfecção da ordem de 74,1% quando utilizaram hipoclorito de cálcio (6% p/v) durante 10 min e de 62,5% quando utilizaram Hipoclorito de Sódio (5% p/v) durante 10 min (resultado em desacordo com este estudo, para este desinfectante obteve-se uma taxa de descontaminação de apenas 24,4%). Neste estudo os melhores resultados de desinfecção foram obtidos com o método de Peróxido de Hidrogénio que, em qualquer dos tempos utilizados, apresentou uma taxa de descontaminação sempre superior a 88,8%. A partir deste momento todas as culturas passaram a ser desinfectadas tendo por base o método 2. Assim a pré-descontaminação de superfície (que consistia numa lavagem por água corrente e passagem por etanol a 96°, durante 1 min.) era conduzida, ainda, fora da câmara de fluxo laminar. O material era então desinfectado, no interior da câmara de fluxo laminar, por uma solução de Peróxido de Hidrogénio e detergente (30% de água oxigenada a 160 V e 5 gotas de Teepol®) durante 10 min.. Findo o tempo de desinfecção, o material era lavado em água destilada estéril, em três passos, cada um com duração de 5 min.. Em seguida, procedia-se à cultura em meio apropriado.

A produção de plântulas só era conseguida de forma indirecta utilizando o método de GONÇALVES e RAINHO (1992). Este método consistia na indução de raízes em porções aéreas (de cerca de 3 cm de comprimento) subcultivadas *in vitro* que eram colocadas em meio contendo 10 mgL^{-1} de IBA durante sete dias, findos os quais eram transferidas e mantidas durante quatro semanas, em meio desprovido de reguladores de crescimento. Verificou-se que a formação de raiz é um processo com uma grande variabilidade tendo sido obtidas percentagens de enraizamento tão diferentes como 28,57% e 66,67%. O número de raízes formadas por porção aérea também era muito variável (valor mínimo 1 raiz e valor máximo 6 raízes). Os resultados

obtidos apresentam taxas de eficácia muito inferiores e muito mais variáveis dos de GONÇALVES e RAINHO (1992) (100%) e são mais consonantes com os de MANZANERA e PARDOS (1990).

Para todas as culturas passou-se a utilizar o meio de GDMFL e o método de desinfecção 2. Para produzir porções aéreas recorria-se apenas a gomos axilares. Para produzir tecido caloso recorria-se a segmentos de entrenó intactos (sem corte longitudinal). As folhas não foram utilizadas para multiplicação *in vitro*. Para produzir plântulas recorriam-se às porções aéreas subcultivadas e induzia-se a formação de raiz de forma indirecta.

O material vegetativo assim produzido serviu para a aplicação de testes de patogenicidade e de resistência nos estudos subsequentes. Assim, as partes aéreas subcultivadas podiam ser induzidas a formarem raiz para posterior infecção e avaliação da patogenicidade. As próprias porções aéreas podiam igualmente servir para estes teste. O tecido caloso seria aplicado nos testes de resistência.

3. MANUTENÇÃO, CULTURA, ESPORULAÇÃO E PATOGENICIDADE DE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI*

3.1. INTRODUÇÃO

3.1.1. Manutenção e Cultura de *Phytophthora cinnamomi*

Os meios de cultura das espécies de *Phytophthora* variam de meios naturais (ou orgânicos) a meios sintéticos (ERWIN e RIBEIRO, 1996). Entre os meios naturais mais empregues para este género encontram-se os descritos por ERWIN e RIBEIRO (1996): agar ou caldo de sumo V8 (de MILLER, 1955); agar ou caldo de sumo V8 clarificado; meio de sumo V8-vermiculite para infestação de solos; agar de dextrose de batata (PDA); agar de farinha de aveia; meio de grãos de aveia para infestação dos solos; agar ou caldo de cenoura; agar de farinha de milho; agar de semente de centeio. Estes autores descrevem como meios sintéticos mais comuns para este género os de: Lin e Liang e de Lin *et al.*; Hohl e de Henninger; Davies, meio complexo de aminoácidos; Payette e Perrault; Lopatecki e Newton; Erwin e Katznelson, modificado por Payette e Perrault; Bartnicki-Garcia; Cuppett e Lilly; Hendrix *et al.*; Chee e Newhook; Burrell e de Merz *et al.*; Maas, meio de caseína hidrolisada; Elliott, meio de sacarose-asparagina-EDTA (ERWIN e RIBEIRO, 1996).

No que respeita à cultura de *P. cinnamomi* os meios mais comuns são os naturais. Entre os eleitos para esta espécie encontram-se: agar ou caldo de sumo V8 (de MILLER, 1955); agar ou caldo de sumo V8 clarificado; meio de sumo V8-vermiculite para infestação de solos; agar de dextrose de batata (PDA); agar de farinha de aveia; agar ou caldo de ervilhas verdes; Chee e Newhook (CHEN e ZENTMYER, 1970; HO, 1983; DAVISON *et al.*, 1994; ERWIN e RIBEIRO, 1996).

A exigência de adição de tiamina ao meio de cultura das espécies de *Phytophthora* foi registada por Leonnian e Lilly (1938) e por Payette e Perrault (1944) (citados por ERWIN e RIBEIRO, 1996). HOHL (1983) resume em detalhe o papel da tiamina no crescimento das espécies deste género.

3.1.2. Esporulação de *Phytophthora cinnamomi*

BYRT e GRANT (1979) resumiram os mais importantes passos dados num período de 50 anos para a determinação das condições necessárias para a produção de esporângios que antecede a formação e a libertação de zoósporos do fungo *P. cinnamomi*.

Para *P. cinnamomi*, assim como, para muitas espécies de oomicetas, as principais estruturas de infecção das plantas hospedeiras são os zoósporos. Em laboratório há uma série de condicionantes na produção de zoósporos, como sejam:

- Idade da cultura – culturas com 48 (HALSALL, 1976) a 72 horas (ZHENG e KO, 1996) ou de 3 a 4 dias (HO e ZENTMYER, 1977) iniciadas a partir micélio vegetativo (HALSALL, 1976; HO e ZENTMYER, 1977) ou de zoósporos isolados (ZHENG e KO, 1996);
- Lavagem meticulosa e abundante das mantas miceliais na altura da indução dos esporângios para remover os nutrientes (HALSALL e FORRESTER, 1977; CHEN e ZENTMYER, 1970; BYRT e GRANT, 1979)
- Agitação do meio de esporulação (solução de sais minerais) 24 horas após indução inicial (HALSALL e FORRESTER, 1977; CHEN e ZENTMYER, 1970; BYRT e GRANT, 1979);
- Padronização do volume do meio de esporulação (CHEN e ZENTMYER, 1970; BYRT e GRANT, 1979);
- Remoção adequada do meio de esporulação e substituição com água destilada antes do desfecho da libertação de zoósporos (CHEN e ZENTMYER, 1970; BYRT e GRANT, 1979);
- Colocação sob luz das colónias que foram induzidas a esporularem (CHEN e ZENTMYER, 1970; BYRT e GRANT, 1979).

Os esporângios do género *Phytophthora* formam-se em substratos sólidos assim como em líquidos (ERWIN e RIBEIRO, 1996). A abundância de esporângios, tanto em substratos sólidos como em líquidos, varia com as espécies e dentro de isolados da mesma espécie (ERWIN e RIBEIRO, 1996). No que respeita à espécie *P. cinnamomi* a produção abundante de esporângio dá-se preferencialmente em meio líquido (CHEN e ZENTMYER; BYRT e GRANT, 1979). Os esporângios são, normalmente, produzidos na interface ar/meio líquido, em micélio muito jovem com cerca de 18 a 24 h (CHEN e ZENTMYER; BYRT e GRANT, 1979). A esporulação é um processo complexo envolvendo: o potencial da água; nutrientes; esteróis; arejamento; luz; temperatura; cationes tais como Ca^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} e K^{+} ; idade da cultura; certas bactérias; exsudados de raízes e; extractos de solo (RIBEIRO, 1983). A importância de cada um destes factores varia com as espécies e mesmo dentro de isolados da mesma espécie (RIBEIRO, 1983).

3.1.2.1. Potencial hídrico

O potencial da água é talvez o factor mais importante, quanto à sua influência na produção de esporângios para todas as espécies de *Phytophthora* (RIBEIRO, 1983). Em geral, a humidade relativa a chegar aos 100% ou potenciais de matriz próximos do zero, são altamente estimuladores da formação de esporângios (RIBEIRO, 1983).

REEVES (1975) investigou o efeito do regime de humidade na produção de esporângios por *P. cinnamomi* e concluiu que o factor que controlava a produção de esporângios no solo era a pressão de sucção hídrica (potencial de matriz) em vez de conteúdos hídricos absolutos.

Contagens detalhadas do efeito do potencial hídrico na formação de esporângios na formação de esporângios e na germinação são dadas por DUNIWAY (1983) e GISI (1983).

3.1.2.2. Arejamento

BYRT e GRANT (1989) apresentavam diferenças assinaláveis de produções de zoósporos consoante o arejamento permitido às culturas. Compararam culturas cujas velocidades de agitação eram de 120 ou 60 rpm e obtiveram as diferenças respectivas de 18×10^5 para 10×10^5 unidades/frasco (em tampão MES), 13×10^5 para 8×10^5 unidades/frasco (em tampão HEPES) e 24×10^5 para 3×10^5 unidades/frasco (sem tampão). Concluíram que o aumento da concentração de oxigénio ou a diminuição da concentração em dióxido de carbono eram factores cruciais na produção de zoósporos. Segundo DAVISON e TAY (1986) sob condições anaeróbicas os esporângios ou não eram produzidos ou eram produzidos em baixos números. A proporção de

esporângios produzidos aumentava à medida que a concentração em oxigénio aumentava (DAVISON e TAY, 1986).

3.1.2.3. *Temperatura*

Embora os esporângios sejam formados dentro de uma vasta gama de temperaturas, a gama de temperatura óptima é normalmente muito estreita (RIBEIRO, 1983).

BYRT e GRANT (1989) determinaram a curva de temperatura para determinação da temperatura óptima para a produção de zoósporos. No estudo de BYRT e GRANT (1989) a temperatura para a qual a produção de zoósporos era máxima foi de 21° C (16×10^5 unidades/frasco). Assim a temperatura óptima de crescimento vegetativo do fungo (21-24° C) não diferia substancialmente da temperaturas óptima de produção de zoósporos.

3.1.2.4. *Volume de cultura*

A alteração do volume do meio de cultura afecta o crescimento de micélio e, subsequentemente, da concentração final de zoósporos. BYRT e GRANT (1989) determinaram em diferentes regimes de temperatura (18°, 24° e 28° C), diferenças assinaláveis quando eram utilizados os volumes de 100 ou 50 mL de caldo. Para os menores volumes correspondiam menores produções de zoósporos (BYRT e GRANT, 1989).

3.1.2.5. *Esteróides*

HENDRIX (1964) foi o primeiro a demonstrar como requisito para a esporulação assexuada de espécies de *Phytophthora* a adição de esterol. Em baixas concentrações, os esteróis aumentam o crescimento, estimulam a reprodução assexuada, influenciam a formação de zoósporos, e desempenham um papel chave na formação das estruturas reprodutivas sexuais (RIBEIRO, 1983). O efeito dos esteróis na esporulação em *Phytophthora* é discutido por ELLIOTT (1983).

A adição de β -sitosterol possui um efeito significativo na produção de zoósporos (BYRT e GRANT, 1989). A adição de 1 mg/L deste esterol duplicava a produção de zoósporos, enquanto que a adição de 10 mg/L triplicava (BYRT e GRANT, 1989).

3.1.2.6. Sais minerais e iões

BYRT e GRANT (1989) sugeriram a adição de uma solução de sais minerais (de CHEN e ZENTMYER, 1970) para a formação dos esporângios. Após 24 horas de crescimento a 24° C estes autores registaram o abundante aparecimento de esporângios de forma assíncrona.

Embora a maioria das espécies de *Phytophthora* respondam a um ou mais químicos inorgânicos, *P. cinnamomi* é único na requisição de um balanço preciso de Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ e Fe^{3+} para a formação de esporângios (CHEN e ZENTMYER, 1970).

No que respeita à composição em catiões na solução de lavagem dos tapetes miceliais HALSALL e FORRESTER, em 1977, determinaram que a concentração ideal para *P. cinnamomi* era de 0,71 mM de Ca^{2+} , 0,11 mM de Fe^{3+} , 0,16 mM de Mg^{2+} e 0,62 mM de K^+ .

Por outro lado, para a indução de esporângios, é essencial evitar a contaminação pelo cobre (as canalizações em cobre são uma fonte de contaminação) (ERWIN e RIBEIRO, 1996). Por esse motivo, a água utilizada, ao longo do processo, deverá ser destilada ou, preferencialmente, bidestilada (ERWIN e RIBEIRO, 1996).

3.1.2.7. Extracto de solo e microrganismos

Segundo ZENTMYER (1965) tanto o extracto de solo não estéril, como o extracto de solo estéril possuem um efeito estimulador na produção de esporângios. O extracto de solo não estéril é mais eficaz na produção de esporângios (ERWIN e RIBEIRO, 1996).

As bactérias do solo pertencentes ao género *Pseudomonas* (AYERS e ZENTMYER, 1971 citados por RIBEIRO, 1983) e *Chromobacterium* (ZENTMYER, 1965) têm sido implicadas na formação de esporângios de *P. cinnamomi*. Contudo, BROADBENT e BAKER (1974) não encontraram evidência que implicassem estes dois géneros na formação de esporângios sob as suas condições de teste. Estes autores descobriram que o aquecimento do extracto de solo entre 40 a 50° C durante 10 min. ou os solos tratados com vapor de água a 60° C durante 30 min. não produziam efeitos na produção de esporângio.

3.1.2.8. Luz

A esporulação por *P. cinnamomi* era estimulada apenas por radiação na proximidade da região UV até 100 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (Zentmyer e Ribeiro, 1977 citados por RIBEIRO, 1983). Maiores

intensidades não eram significativamente diferentes das que eram obtidas a 100 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$; contudo, a esporulação nestas intensidades falhava em formar zoósporos.

A utilização do tamanho dos esporângios para propósitos taxonómicos tem, por isso, de ser tratada com cautelas até que as condições uniformes para a produção de esporângios tenham sido estabelecidas (RIBEIRO, 1983).

3.1.2.9. Idade da cultura

Ayers e Zentmyer (1971) (citados por RIBEIRO, 1983) descobriram que a formação de esporângios por *P. cinnamomi* decrescia com o aumento da idade da cultura sob condições estéreis.

As espécies de *Phytophthora* de crescimento no solo, normalmente, produzem esporângios quando o micélio jovem, de crescimento rápido, é transferido de um meio relativamente rico para um regime pobre em nutrientes, por lavagens frequentes com água ou solução de sais minerais (ERWIN e RIBEIRO, 1996).

3.1.2.10. pH

Para o género *Phytophthora* os esporângios podem-se formar numa vasta gama de pH. Para *P. cinnamomi*, BYRT e GRANT (1989) determinaram o pH óptimo na região do 6,8 para a produção de zoósporos (12×10^5 zoósporos/frasco).

3.1.2.11. Duração da produção de esporângios

Atendendo ao tempo necessário para a produção de esporângios por algumas espécies de *Phytophthora* após a transferência para o meio diferente de indução verifica-se que *P. cinnamomi* é a espécie que requer um menor tempo (8 a 36 h) (CHEN e ZENTMYER, 1970). Por contraposição *P. infestans* é aquela que necessita de um maior tempo (1 semana) (Hodgson e Grainger, 1964 citados por ERWIN e RIBEIRO, 1996).

3.1.2.12. Germinação de esporângios

A produção de zoósporos a partir dos esporângios é uma parte extremamente importante do ciclo de vida de *Phytophthora*, especialmente porque permite à população aumentar rapidamente e dispersar mais vastamente quando a água livre está disponível (ERWIN e RIBEIRO, 1996). O arrefecimento das culturas de esporângios abaixo dos 10° C, para a maioria das espécies, estimula a formação de zoósporos (ERWIN e RIBEIRO, 1996). A germinação indirecta, é o processo que ocorre em *P. cinnamomi* e que consiste na diferenciação do citoplasma dentro do esporângio em zoósporos discretos que são então libertos através de um poro de saída (RIBEIRO, 1983). Em geral, os esporângios diferenciam-se e libertam zoósporos na presença de água livre e a temperaturas abaixo daquelas que favorecem o crescimento óptimo dos fungos, geralmente abaixo de 10° C (RIBEIRO, 1983; ERWIN e RIBEIRO, 1996).

3.1.2.13. Mobilidade duração dos zoósporos

A duração da mobilidade dos zoósporos é influenciada pelo ambiente físico, particularmente pela temperatura (RIBEIRO, 1983). Em geral, quanto mais baixa for a temperatura, maior será a duração da mobilidade (RIBEIRO, 1983).

A mobilidade dos zoósporos dos oomicetas é conseguida mediante a acção de dois flagelos que emergem do centro de um sulco existente ao longo da superfície ventral da célula (HARDHAM, 2006). Os flagelos possuem uma estrutura interna típica dos flagelos dos eucariontas, mas os zoósporos são descritos como sendo heterocontes, uma vez que diferem na sua morfologia externa (HARDHAM, 2006). O flagelo mais curto possui duas filas de mastigonemas tubulares e tripartidos e é responsável pelo movimento para a frente, enquanto que o flagelo mais longo é responsável pelas mudanças de direcção (HARDHAM, 2006). Um único zoósporo pode cobrir distâncias de alguns centímetros a velocidade aproximada de 200 µm/s (HARDHAM, 2005).

RIBEIRO (1983) sistematizou os tempos representativos para a duração da mobilidade de algumas espécies de *Phytophthora*.

3.1.2.14. Germinação dos zoósporos

Os zoósporos do género *Phytophthora* são capazes de nadarem durante horas ou mesmo dias, graças o armazenamento interno de energia (sob a forma de micolaminas e lípidos) (HARDHAM, 2006).

A seguir a um período de mobilidade com duração variável consoante o ambiente físico, os zoósporos submetem-se a um re-arranjo arquitectural notável que resulta na perda do flagelo, síntese de novo de parede celular, e emergência de um tubo germinativo (RIBEIRO, 1983). Particularmente, quando os zoósporos encontram uma superfície de uma espécie vegetal adoptam uma orientação específica, voltando-lhe as suas superfícies ventrais (HARDHAM, 2005; HARDHAM, 2006). Nesta fase enquistam, destacando os flagelos e segregando material adesivo para se tornarem imóveis e firmemente aderentes à planta (HARDHAM, 2005; HARDHAM, 2006). Surge então (num processo que pode demorar 5 a 10 min.) uma parede celular celulósica capaz de manter a turgescência da célula (HARDHAM, 2006). Os mecanismos que condicionam o enquistamento dos zoósporos incluem estímulos químicos e físicos, a agitação, o frio, a concentração de cálcio e ácido fosfatídico (HARDHAM, 2006).

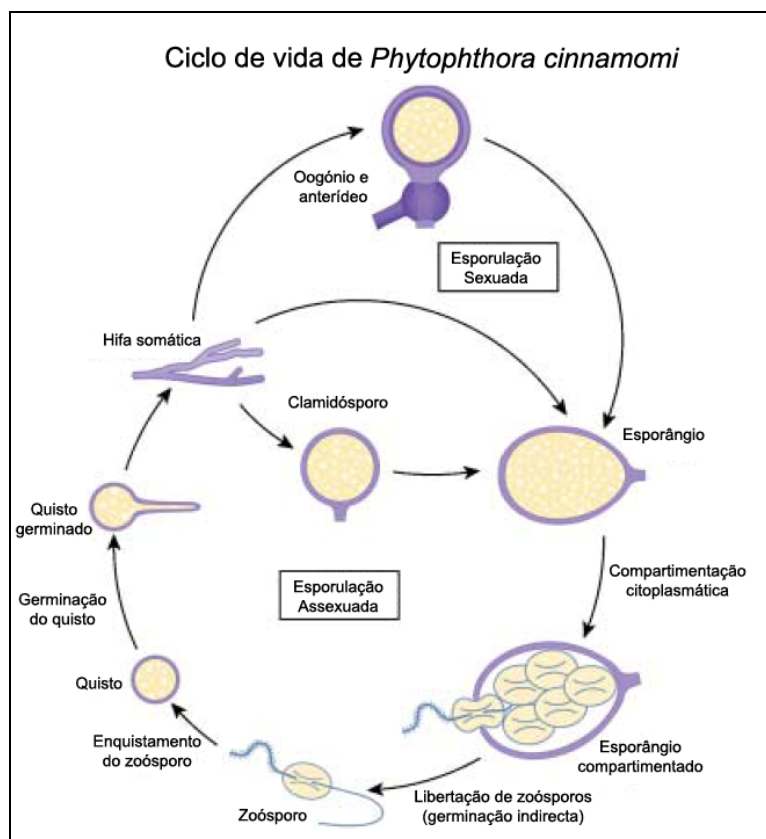


Fig. 3-1: Ciclo de vida de *Phytophthora cinnamomi*.
[Adaptado de HARDHAM (2005)]

O ciclo de vida de *P. cinnamomi* compreende dois tipos de esporulação, designadamente: sexuada e; assexuada. Na natureza as formas de desenvolvimento mais frequentes são do tipo crescimento de hifas somáticas e reprodução por formação de esporângios e de clamidósporos por via assexuada (RIBEIRO, 1983; BYRT e GRANT, 1989; ERWIN e RIBEIRO, 1996). Na natureza, em condições excepcionais, é possível a reprodução sexuada com desenvolvimento de oogónios e anterídeos e formação subsequente de oosferas. Este acontecimento é pouco frequente e é uma forma possível de recombinação genética para valorização do património hereditário do fungo. Ocorre apenas quando os tipos de acasalamento A1 e A2 entram fisicamente em contacto (BRASIER, 1992a). Quando as condições ambientais favoráveis prevalecem o fungo segue o seu ciclo de vida por via assexuada com o desenvolvimento de esporângios multinucleados a partir das hifas somáticas. No estado de maturação, os esporângios, compartimentam-se em unidades uninucleadas, eclodem e libertam cerca de 20 a 30 zoósporos biflagelados (HARDHAM, 2005). Os zoósporos nadam, dirigindo-se especificamente para os ápices radiculares das plantas hospedeiras, onde enquistam, germinam e penetram os tecidos do hospedeiro (KHEW e ZENTMYER, 1973; HALSALL, 1976; ZENTMYER, 1994). A via assexuada pode repetir-se em rápidas sucessões amplificando o potencial de *inoculum* na área infestada (HARDHAM, 2005). A esporulação assexuada carece de um ambiente líquido, tanto para o desenvolvimento dos esporângios como para a libertação de zoósporos (BYRT e GRANT, 1989).

3.1.3. Infecção

P. cinnamomi produz esporângios assexuais deiscentes (caducos), capazes de germinarem indirectamente, isto é, de produzirem zoósporos móveis aptos de percorrerem distâncias consideráveis e interagirem com as células da raiz de uma determinada planta (HARDHAM, 2006). Estes zoósporos nadam especificamente em direcção às raízes dos seus potenciais hospedeiros, movidos tanto por mecanismos químicos como físicos e eléctricos (TYLER, 2002).

Como os fungos patogénicos, os oomicetas são reconhecidos por dependerem fortemente da actividade das enzimas degradadoras das paredes celulares para penetrarem nas superfícies das espécies vegetais e por segregarem moléculas envolvidas na contra-defesa (como inibidores da glicanase e da protease) (HARDHAM, 2006).

Após penetrar a epiderme da espécie vegetal, *P. cinnamomi* pode crescer tanto intercelular como intracelularmente, adquirindo os nutrientes de que necessita a partir de células mortas ou moribundas (HARDHAM, 2006). As plantas são capazes de responder rapidamente à tentativa de infecção por parte dos agentes patogénicos oomicetas, aumentando rapidamente a concentração do Ca^{2+} , promovendo a agregação citoplasmática e depositando parede na vizinhança da hifa invasora, reorganizando o citosqueleto e o sistema endomembranar, sintetizando proteínas

relacionadas com a patogénese (PR) e fitoalexinas e promovendo a morte celular hipersensível (HARDHAM, 2006)

3.2. METODOLOGIA

3.2.1. Origem do Material Fúngico

O fungo (*P. cinnamomi*) foi obtido por compra ao International Mycological Institute (IMI) e por oferta da Doutora Adrienne Hardham (H1000) (Plant Cell Biology Group, Research School of Biological Science, Australian National University).

A estirpe IMI 077375 foi isolada em 1991, em França, a partir de *Castanea sativa*, e trata-se de um tipo de acasalamento A2.

A estirpe H1000 (DAR 52646, ATCC 200982) foi originalmente isolada a partir de uma amostra de solo colhida em Brisbane Ranges (Vitória, Austrália), e trata-se de um tipo de acasalamento A2.

3.2.2. Metodologia Aplicada a *Phytophthora cinnamomi*

3.2.2.1. Cultura de *P. cinnamomi*

Procedeu-se à manutenção das culturas fúngicas de *P. cinnamomi* (estirpes IMI 077375 e H1000), nos seguintes meios de cultura: PDA (Potato Dextrose Agar Difco®) e V8A [Vegetable Juice Agar (V8 – Vegetable Juice da Campbell Grocery Products, Ld. England) (MILLER, 1955)].

O meio de PDA é utilizado para manutenção de micélio viável, durante maiores períodos de tempo, dado o lento crescimento do fungo neste meio.

O meio V8A é ideal para obtenção de grandes quantidades de micélio, num curto período de tempo.

A temperatura para o crescimento de micélio foi de $24 \pm 1^\circ \text{C}$. O micélio crescia sob condições de obscuridade.

a. Preparação de meio de PDA

Para preparar meio de cultura PDA (Potato Dextrose Agar DIFCO®), pesavam-se 17,5 g do meio pulverizado e 16 g de agar e diluía-se em 1L de água destilada. O pH era ajustado a 7,0 e a mistura era autoclavada, durante 15 min., a 121° C e a 1 atm.

b. Preparação dos meios de sumo V8

A preparação de sumo V8 (MILLER, 1955) requeria a utilização de uma lata de sumo V8 (Campbell Soup Company, Ld. England) de 360 mL. Eram pesados 5,5 g de CaCO₃ que eram adicionados ao sumo. A mistura era então clarificada por centrifugação. O sobrenadante era recolhido e congelado a -20° C em alíquotas de 50 mL, 25 mL ou 5 mL. De acordo com os métodos para produção de zoósporos era necessário preparar, posteriormente, meio V8A (10%), V8B (5%) e V8B (1%).

c. Preparação de meio V8A a 10%

Para a preparação de meio V8A 10%, descongelavam-se 50 mL do sumo V8, previamente preparado, diluía-se em 500 mL de água destilada. O acerto do pH era feito entre 6-6,5. Pesavam-se 7,5 g de agar e adicionavam-se ao sumo V8. A esterilização era conduzida em autoclave a 121° C, 1 atm, durante 15 min. O meio era, então, distribuído por placas de petri, assim que arrefecesse a 45° C.

d. Preparação de meio V8B a 5%

Para a preparação de meio V8B 5%, descongelavam-se 25 mL do sumo V8, previamente preparado, diluía-se em 500 mL de água destilada. O acerto do pH era feito entre 6-6,5. A esterilização era conduzida em autoclave a 121° C, 1 atm, durante 15 min.

e. Preparação de meio V8B a 1%

Para a preparação de meio V8B 1%, descongelavam-se 5 mL do sumo V8, previamente preparado, diluía-se em 500 mL de água destilada. O acerto do pH era feito entre 6-6,5. O meio era distribuído em tubos de ensaio. Os tubos eram rolhados e a esterilização era conduzida em autoclave a 121° C, 1 atm, durante 15 min.

3.2.2.2. Métodos para obtenção de zoósporos de *P. cinnamomi*

Depois de tentados, sem êxito, diversos métodos para a produção de zoósporos, foram obtidas estas estruturas de infecciosidade a partir dos métodos que seguidamente se descrevem.

Para produção de zoósporos procedeu-se segundo os métodos de: BYRT e GRANT (1970) e de Gees e Coffey modificado (CHAMBERS *et al.*, 1995), que passamos a designar por método de CHAMBERS *et al.*, 1995. Neste último método, procedeu-se a substituição do extracto de solo por solução de sais minerais de Chen e Zentmyer modificada (DEARNALEY *et al.* 1996), para redução de problemas relacionados com contaminações, sem que houvesse diferenças expressivas no número de zoósporos obtidos, por mililitro.

a. Método de BYRT e GRANT (1979) para produção de zoósporos

A partir de culturas de *P. cinnamomi*, com 5 dias de idade, a crescerem em meio de sumo V8 a 10% agarizado (V8A 10%), removem-se, com a ajuda de um fura-rolhas esterilizado, cilindros com diâmetro de base de 6 mm, da frente de avanço da colónia. Os cilindros de agar, com hifas, são colocados sob círculos de Miracloth™ (Calbiochem®, USA) estéreis, previamente, colocados em placas de petri com meio V8A 10%. As placas assim preparadas são colocadas numa estufa incubadora a 24° C. Após 2 dias de crescimento, os discos de Miracloth™, com o tapete micelial aderente, são transferidos para 100 mL de caldo V8 a 5% (V8B 5%). Os frascos de culturas assim preparados são colocados numa câmara incubadora (24 ± 1° C) com agitação orbital (150 opm), durante 19 horas. Findo este tempo, os tapetes miceliais são lavados 3 vezes em solução estéril de CHEN e ZENTMYER (1970), e são ressuspensos em 40 mL desta solução. Os frascos de cultura assim preparados são novamente agitados a 150 opm durante 24 h, período durante o qual se formam os esporângios. Após a produção dos esporângios, os zoósporos são libertados por lavagem dos tapetes miceliais com água destilada estéril pré-arrefecida (18° C) e incubados em 40 mL de água destilada estéril, a 18° C durante 15 minutos. Findo este período, eleva-se a temperatura para 24° C e incubam-se durante mais 50-90 minutos. As suspensões obtidas, são filtradas por papel Whatman® n.º 541, num sistema Millipore (Sterifil® Aseptic System and Holder) esterilizado. O filtrado é recolhido para contagem e infecção das culturas de *Quercus suber* (ver cronograma no Anexo III).

b. Método de CHAMBERS *et al.* (1995) para produção de zoósporos

Procede-se à preparação de culturas rejuvenescidas, incubando um cilindro com base de 4 mm de diâmetro, de micélio de *P. cinnamomi*, em placas contendo meio V8A a 10%. As culturas crescem numa estufa incubadora a 24 ± 1° C, sob escuridão, durante 72 h. A partir das culturas

rejuvenescidas procede-se à incubação de 10 cilindros com diâmetro de base de 4 mm, obtidos com o auxílio de um fura-rolhas esterilizado, da frente de avanço da colónia de *P. cinnamomi*, em placas contendo, aproximadamente, 15 mL de meio V8B a 5%. As placas de petri assim preparadas são colocadas numa estufa incubadora durante 24 h, a 24° C sob luz fluorescente branca. Terminado este período, os micélios são lavados por 3 vezes com solução de Chen e Zentmyer modificada (Solução 1 + Solução 2, misturadas na altura). Os tapetes miceliais são alagados em, aproximadamente, 10 mL de solução de Chen e Zentmyer e incubados durante 48 h, para produção de esporângios. Os tapetes miceliais são, então, lavados duas vezes com água destilada estéril a 4° C e ressuspensos em 10 mL de água destilada estéril (4° C). As placas são colocadas a 4° C, durante 30 min. A libertação dos zoósporos dá-se a 18° C, durante um período de 60-90 min. A porção líquida das placas é recolhida para contagem e infecção das culturas de *Quercus suber* (ver cronograma no Anexo IV).

i. Preparação de solução de sais minerais de Chen e Zentmyer (DEARNALEY *et al.*, 1996)

A solução de Chen e Zentmyer é misturada apenas na altura da utilização para a produção de zoósporos e envolve a preparação de duas soluções distintas: a Solução 1 – composta por 10 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 5 mM KNO_3 , 4 mM MgSO_4 , diluídos em água destilada e esterilizada por autoclavagem durante 15 min., a 121° C e a 1 atm; Solução 2 – composta por 10 mM Na_2EDTA e 10 mM FeSO_4 , diluídos em água destilada e esterilizada por filtração (membrana de nitrato de celulose, Sartorius®, 0,22 µm).

ii. Preparação de extracto de solo estéril (CHAMBERS *et al.*, 1995)

O extracto de solo estéril era preparado pesando 10 g de solo e suspendendo em 1 L de água destilada (1% de solo). A suspensão era então filtrada por Whatman® n.º1 e o filtrado esterilizado em autoclave a 121° C, 1 atm, durante 30 min.

iii. Preparação quantificação da densidade de *inoculum*

Como método de contagem directa, recorreu-se à contagem dos zoósporos num hematocitómetro (Bright-Line® da Sigma). Contudo este método revelou-se falível, dada a grande heterogeneidade entre as várias colheitas de uma mesma amostra. Deste modo, recorreu-se a um método de contagem indirecta, pela técnica do Número Mais Provável (NMP).

Técnica do Número Mais Provável (NMP) é, particularmente, útil para contagens de organismos existentes em concentrações diminutas (inferior a 100 por mL) (BLODGETT, 2001). Apenas os organismos viáveis são contabilizados pelo método NMP (BLODGETT, 2001). Como premissas básicas deste método temos que: a amostra deverá ser preparada de tal forma que os organismos a contabilizar deverão estar distribuídos homogeneamente; os organismos deverão estar separados, sem estarem aglomerados, nem devem repelirem-se uns aos outros; o meio de

crescimento e as condições de incubação têm de ser escolhidas de forma que o *inoculum* que possui apenas um organismo viável irá produzir crescimento detectável (BLODGETT, 2001).

Após a libertação dos zoósporos, nos dois métodos de produção utilizados, a solução contendo os zoósporos (móveis) prosseguia para determinação do NMP de zoósporos por mililitro. A solução era, então, agitada vigorosamente (num vórtex) durante 1 minuto. Este procedimento servia para enquistar os zoósporos (imóveis) que, desta forma, passariam a estar melhor distribuídos na solução. Imediatamente, passava-se a proceder ao método das diluições em séries de tubos. Usaram-se séries de 5 tubos, 3 diluições (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ou 10^{-4}). Após o procedimento de diluição inoculavam-se os tubos de cultura (V8B a 1%) com 1 mL. Os tubos eram devidamente rotulados e incubados a $24 \pm 1^\circ \text{C}$, sob condições de obscuridade, durante 72 horas. Após o período de incubação procedia-se à contagem do número de tubos positivos (com crescimento positivo) para contabilização número de zoósporos por mililitro em cada processo de infecção.

iv. Preparação de meio V8B a 1% para contagem indirecta de zoósporos (NMP)

O meio V8B 1% previamente preparado era distribuído em tubos de ensaio, em porções de 9 mL (séries de 5x3 tubos). Os tubos eram devidamente rolhados e esterilizados por autoclavagem, durante 15 min., a 121°C 1 atm.

3.2.3. Testes de Patogenicidade

Os testes de patogenicidade foram aplicados de acordo com o método de CHAMBERS *et al.*, (1995) por inoculação de ápices de raízes de plântulas micropropagadas de *Q. suber*. Porções aéreas de 3 cm de comprimento, provenientes de meio GDMFL-PA, foram transferidas para meio GDMFL-IR, 7 dias depois foram transferidas para meio GDMFL, onde ficam a crescer durante 4 semanas. As plântulas (com raízes de cerca de 6 cm) foram cuidadosamente removidas de forma a não danificar as raízes (para cada tratamento foram usadas 10 exemplares). As raízes foram estendidas em água agarizada (10 gL^{-1}) em placas de petri ou em frascos rolhados (referência D32 e A728, ver Capítulo 2). Nos ensaios controlo num dos ápices radiculares das plântulas foram colocados 10 μL de água destilada estéril e nos ensaios de infecção um dos ápices radiculares foi inoculado com 10 μL de uma suspensão de zoósporos (10^4 zoósporos. mL^{-1}).

3.2.4. Recolha e Tratamento dos Dados

As contagens indirectas de zoósporos foram conduzidas 72 horas após a inoculação das séries de 5 tubos. O método de contagem indirecta, pela técnica do Número Mais Provável (NMP)

consiste na enumeração dos tubos positivos em cada diluição. A contagem dos tubos positivos para cada diluição fornece uma chave numérica (combinação de tubos positivos) que permite a extrapolação a partir das tabelas de NMP (BLODGETT, 2001), ou a determinação a partir de uma folha de cálculo Excel para calcular os valores (BLODGETT, 2001), ou o cálculo a partir do programa MPN Calculator (de Mike Curiale), para ambiente Windows. No estudo em causa para estimar o NMP, foi a tabela de NMP em anexo (Anexo V). Em rigor, o NMP deverá ser expresso em unidades formadoras de colónias (UFC), contudo, no sentido de facilitar a leitura, referem-se as determinações por este método em número de zoósporos por mililitro.

Para todos os ensaios de patogenicidade fizeram-se observações diárias, prolongadas por sete dias.

Os dados relativos à interacção entre o hospedeiro e o agente patogénico apresentados neste capítulo reportam-se às observações feitas durante os sete dias e foram tratados pela ferramenta informática SPSS 13.0 para ambiente Windows.

O Gráfico 3-1 (de barras) foi elaborado pelo programa informático Excel (Versão 2003 para ambiente Windows) e representa os valores médios obtidos para o NMP, para o mínimo e para o máximo obtidos após a consulta da tabela no Anexo V. O Gráfico de barras 3-2 foi elaborado recorrendo à mesma ferramenta informática e representa os valores médios das observação da sintomatologia feitas por três observadores independentes. Neste gráfico estão patentes as duas estirpes experimentadas e a evolução da sintomatologia durante um período de 7 dias.

O cálculo do incremento na taxa de produção de zoósporos foi conduzido recorrendo à fórmula:

$$TIPZ = \left(\frac{NMP_{\max} - NMP_{\min}}{NMP_{\max}} \right) \times 100, \text{ onde}$$

TIPZ – Taxa de Incremento da Produção de Zoósporos

*NMP*_{max} – Número Mais Provável máximo (obtido pelo método de CHAMBERS *et al.*, 1995)

*NMP*_{min} – Número Mais Provável mínimo (obtido pelo método de BYRT e GRANT, 1979)

Para testar as hipóteses foram utilizados os testes estatísticos de ANOVA em ordem a Kruskal-Wallis (teste não-paramétrico). Estes testes foram aplicados alternativamente aos testes paramétricos, uma vez que para as variáveis testadas as amostras, mesmo depois de transformadas, ou não possuíam uma distribuição normal, ou não eram homogéneas ou eram de pequena e diferente dimensão (MAROCO, 2003). Procedeu-se à verificação da normalidade aplicando o teste de Kolmogorov-Smirnov e da homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene.

O limite de confiança aceite foi igual ou superior a 95%. Na avaliação do nível de significância o valor de *p* pode ser classificados em quatro grupos: sem significância; com

significância entre 0,05 e 0,01; com significância entre 0,01 e 0,001 e; maior que 0,001. Assim de acordo com o representado na Tabela 3-1, temos:

Tabela 3-1: Correspondência do nível de significância com o resultado do teste estatístico e com a sinalética utilizada na apresentação de resultados.

Valor de p	Resultado do teste	Comentário	Sinalética
Maior que 0,05	Aceitar a Hipótese Nula (H_0)	Não há evidências para rejeitar H_0	NS
Entre 0,01 e 0,05	Rejeitar H_0 (Aceitar H_1)	Há algumas evidências para rejeitar H_0 (por isso aceitar H_1)	*
Entre 0,001 e 0,01	Rejeitar H_0 (Aceitar H_1)	Há uma forte evidência para rejeitar H_0 (por isso aceitar H_1)	**
Menor que 0,001	Rejeitar H_0 (Aceitar H_1)	Há uma evidência muito forte para rejeitar H_0 (por isso aceitar H_1)	***

Nas tabelas onde são apresentados os testes estatísticos a sinalética “NS” corresponde a não significativo, “*” pouco significativo, “**” significativo e “***” muito significativo.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Manutenção, Esporulação e Libertação de Zoósporos

A obtenção de esporângios funcionais, libertadores de zoósporos, foi uma tarefa que se revelou difícil. Depois da aplicação de muitos outros métodos descritos na literatura, sem sucesso, foi possível este intento com a aplicação dos métodos de BYRT e GRANT (1970) e o de CHAMBERS *et al.*, 1995. Assim sendo, a partir de culturas iniciadas em meio V8A a 5% (Fig. 3-2) foi possível seguir o processo de indução de esporângios funcionais (Fig. 3-4 e Fig. 3-5) e posterior libertação de zoósporos (Fig. 3-6 e Fig. 3-7).

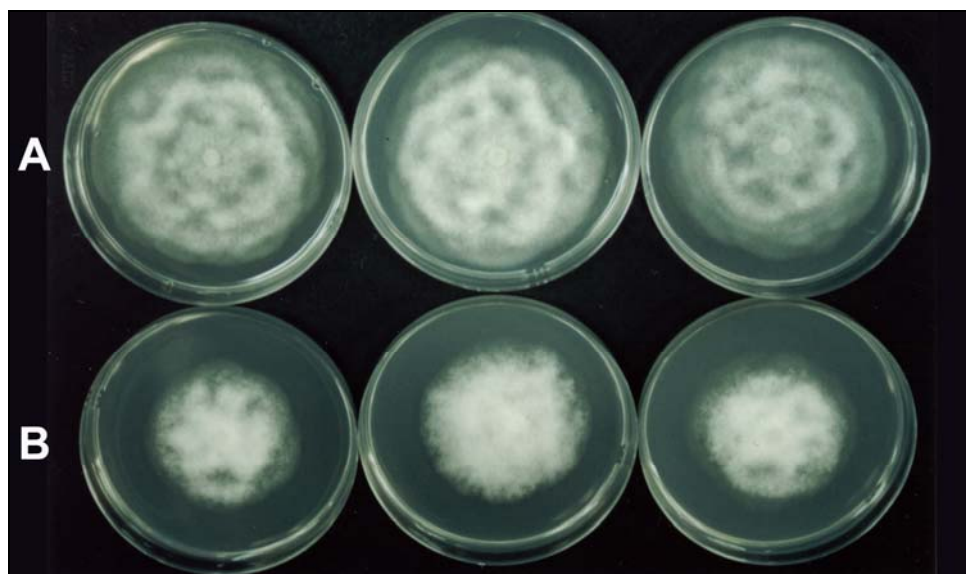


Fig. 3-2: Aspecto geral do crescimento ao fim de oito dias em meio V8A a 5% dos isolados.

A – Estirpe H1000; B – Estirpe IMI 077375.

Da análise da Fig. 3-2 é possível verificar um comportamento de crescimento distinto entre as duas estirpes testadas. A estirpe H1000 apresentava uma taxa de crescimento cerca de duas vezes superior ao da estirpe IMI 077375, nas mesmas condições de cultura. Estava-se, portanto, na presença de duas estirpes com graus de crescimento e morfologias da colônia dissemelhantes. A colônia da estirpe H1000 possuía uma morfologia em rosácea, com micélio aéreo e submerso. A estirpe IMI 077375 com uma morfologia menos típica, algodonosa, e com pouco micélio submerso.

Na Fig. 3-3 é possível atestar o aspecto geral das hifas miceliais do tipo coraliforme por micrografia em lupa estereoscópica.

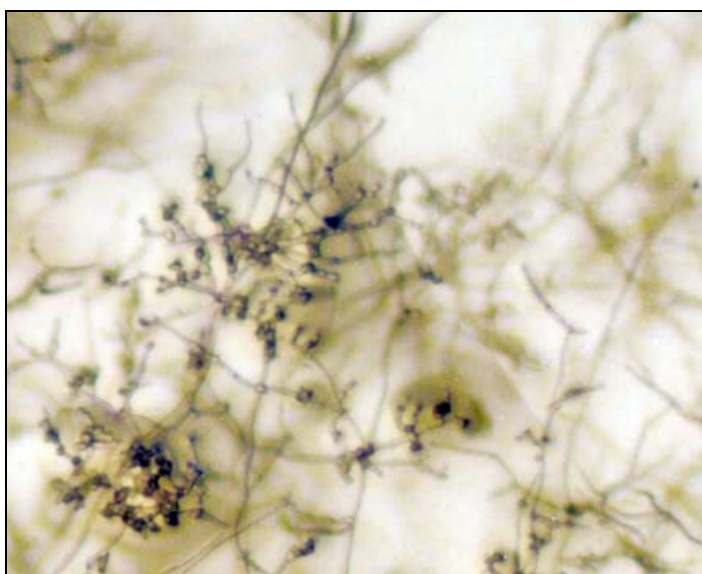


Fig. 3-3: Aspecto geral das hifas coraliformes de *Phytophthora cinnamomi*. (10 x)

Em relação à morfologia microscópica do micélio não se registaram diferenças expressivas, isto é o micélio das duas estirpes apresentava um aspecto coraliforme, frequentemente pontuado de formações esféricas densamente acastanhadas, de parede espessa – os clamidósporos (de dimensões semelhantes).

Na Fig. 3-4 apresenta-se uma micrografia em lupa estereoscópica de esporângios de *P. cinnamomi*.

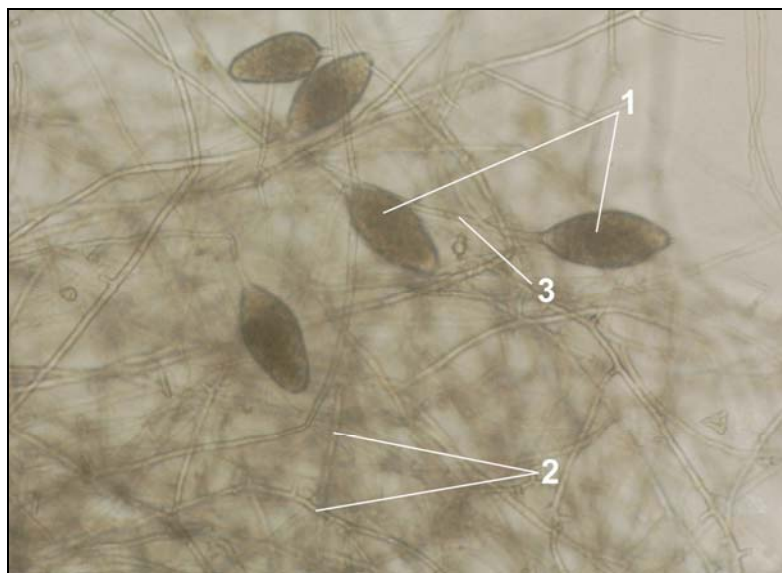


Fig. 3-4: Aspecto geral da produção de esporângios
1 – Esporângios; 2 – Esporangióforo; 3 – Micélio cenocítico (20 x).

A micrografia em lupa estereoscópica representada na Fig. 3-4 mostra o aspecto geral da produção de esporângios em *P. cinnamomi*. Estes esporângios estão sobretudo restritos às frentes de avanço do micélio. Estão mais ou menos agregados em pequenos conjuntos, distinguem-se facilmente pela cor densamente castanha que apresentam. Possuem grandes dimensões, forma lanceolada. e são do tipo não papilados. Não se registaram diferenças expressivas na localização das massas esporangiais, nem na morfologia e dimensão dos esporângios das duas estirpes de agente patogénico.

Na Fig. 3-5 é possível notar ampliações de esporângios funcionais, compartimentados.

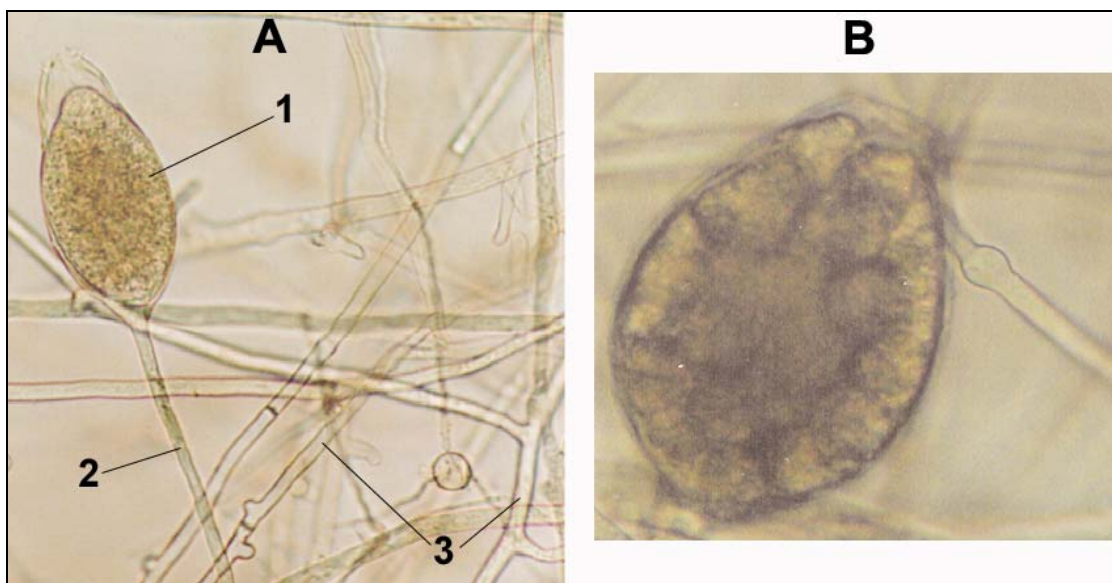


Fig. 3-5: Aspecto particular de esporângios funcionais.

A – Micrografia de um esporângio funcional: 1 – Esporângio; 2 – Esporangióforo; 3 – Micélio cenocítico (40 x); B – Aspecto da compartimentação de um Esporângio funcional (100x).

Na figura anterior, as micrografias exibem dois esporângios funcionais nos quais é possível constatar um conteúdo esporangial já compartimentado em pequenas células (cerca de 20 ou 30, que constituirão os futuros zoósporos). Tratam-se de esporângios nos momentos imediatos antes da libertação dos zoósporos.

Na Fig. 3-6 é possível constatar a ampliação de um esporângio funcionais deiscente.

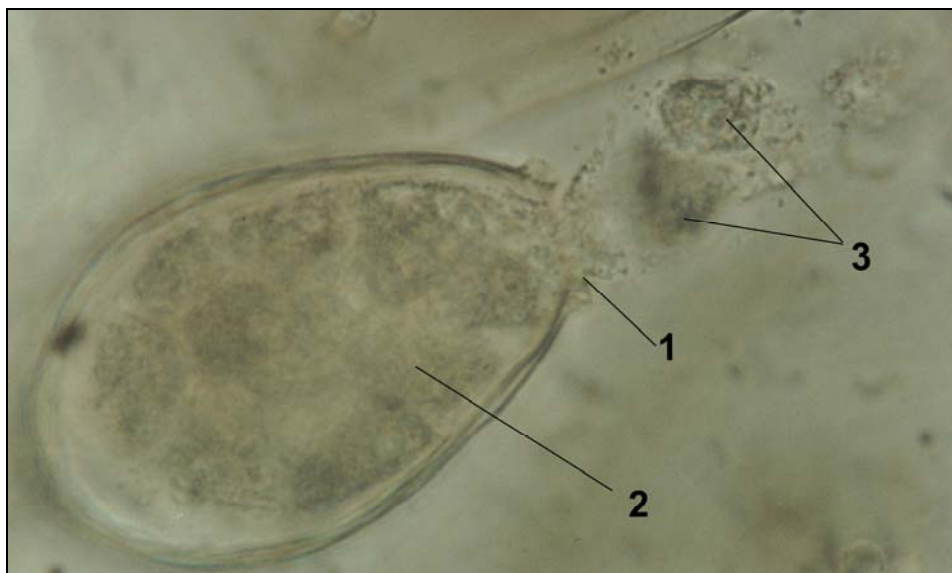


Fig. 3-6: Deiscência de um esporângio e libertação de zoósporos.

1 – Abertura de deiscência; 2 – Conteúdo do esporângio; 3 – Zoósporo envolto de restos esporangiais (100 x).

A micrografia representada na Fig. 3-6 exibe o momento exacto da eclosão de um esporângio onde é possível observar a libertação de células mais ou menos esféricas (uninucleadas) envoltas em restos esporangiais.

Na Fig. 3-6 exibem-se vários estádios de desenvolvimento dos zoósporos e dos quistos, resultantes da deiscência esporangial. Cada esporângio pode libertar até 30 zoósporos, com capacidade própria de locomoção em meio líquido. Cada zoósporo nada orientadamente em direcção aos ápices radiculares das plantas hospedeiro.



Fig. 3-7: Aspecto de várias fases de desenvolvimento dos zoósporos e quistos.

A – Zoósporo (móvel) em vista lateral (100 x); B – Zoósporo (móvel) em vista ventral, notar o aspecto cordiforme: 1 – Sulco (onde está situado o flagelo mais curto) (100 x); C – Dois zoósporos (em movimento) e dois quistos em fase inicial de germinação: 2 – Zoósporos em movimento; 3 – Quisto em fase precoce de germinação; 4 – Quisto em início de germinação (40 x); D – Zoósporo a iniciar o processo de enquistamento: 5 – Flagelo (100x); E – Quisto: 6 – Espessamento da parede; F – Quisto em início de germinação (40 x); G – Quisto deiscente (100 x); H – Quisto germinado: 7 – Espessamento da parede; 8 – Hifa de penetração (80 x).

Na Fig. 3-6 as micrografias exibem vários estádios de desenvolvimento dos zoósporos e dos quistos. Os zoósporos são células móveis que apresentam secção cordiforme e são biflagelados: o flagelo mais curto repousa no sulco ventral (1); o outro (5), bem mais longo, emerge da região apical do zoósporo e chicoteia de forma a possibilitar o seu movimento. Os zoósporos permanecem em movimento durante um período relativamente alargado (de forma a permitir a dispersão do fungo para novas áreas) e quando se alteram as condições ambientais ou quando o zoósporo encontra uma planta alvo, enquista (E). Forma-se uma parede celular mais espessa (6) e, numa fase precoce da germinação do quisto (F), forma-se um pequeno tubo germinativo, a partir do qual emergirá a hifa de penetração (8).

3.3.2. Densidade de *Inoculum*

Por aplicação dos dois métodos para obtenção de zoósporos, seguida por quantificação indirecta pelo método do Número Mais Provável foram obtidos resultados constantes na Tabela 3-2: para cada estirpe obtiveram-se 14 resultados, sendo 6 para o método de BYRT e GRANT (1979) e 8 para o método de CHAMBERS *et al.* (1995).

Tabela 3-2: Número de zoósporos.mL⁻¹ obtido para as duas estirpes de *Phytophthora cinnamomi* pelos métodos de CHAMBERS *et al.* (1995) e BYRT e GRANT (1979).

Método de CHAMBERS <i>et al.</i> (1995) (Número de zoósporos.mL ⁻¹)		Método de BYRT e GRANT (1979) (Número de zoósporos.mL ⁻¹)	
H1000	IMI 077375	H1000	IMI 077375
5,00E+03	2,50E+02	1,20E+02	4,90E+01
5,60E+03	6,00E+02	1,35E+02	2,10E+01
6,80E+03	1,40E+02	1,02E+02	1,80E+01
1,10E+04	9,20E+02	9,80E+01	1,50E+01
8,70E+03	1,60E+02	2,05E+02	2,30E+01
6,40E+03	1,70E+02	1,63E+02	3,10E+01
5,00E+03	2,50E+02	-	-
5,60E+03	6,00E+02	-	-

No Gráfico 3-1 apresentam-se os valores médios e o desvio padrão associado ao Número Mais Provável e aos Valores Máximo e Mínimo, quando aplicados dois métodos de produção de zoósporos.

Para o método de BYRT e GRANT (1979), a média de produção para H1000 foi de 137,2 (±42,1) zoósporos por mililitro (valor máximo 373,3±104,1, valor mínimo 50,2±17,4, para 95% de confiança) e para IMI 077375 foi de 26,2 (±12,5) zoósporos por mililitro (valor máximo 72,7±41,2, valor mínimo 9,3±3,8, para 95% de confiança).

Para o método de CHAMBERS *et al.* (1995), com o qual foram sempre obtidos os melhores resultados, para a estirpe H1000 a média de produção foi de 6612,5 ($\pm 2165,6$) zoósporos por mililitro (valor máximo $18250,0 \pm 3240,4$, valor mínimo $1850,0 \pm 287,8$, para 95% de confiança) e para a estirpe IMI 077375 foi de 392,5 ($\pm 285,5$) zoósporos por mililitro (valor máximo $1143,8 \pm 890,3$, valor mínimo $137,0 \pm 94,5$, para 95% de confiança).

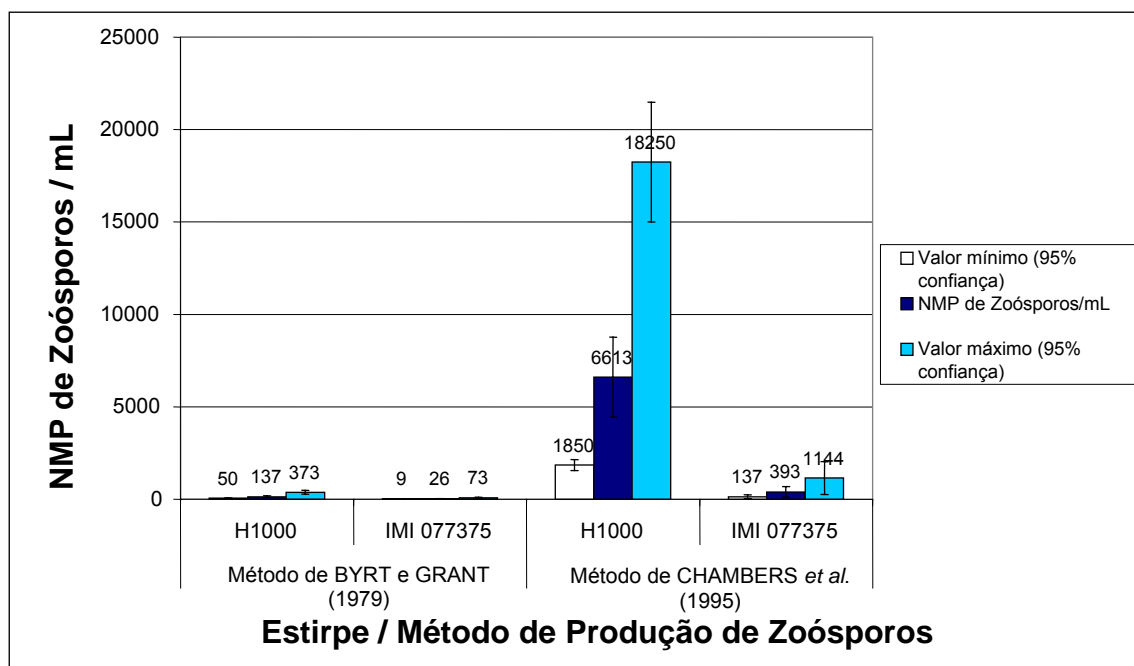


Gráfico 3-1: Representação dos valores médios e do desvio padrão associado para o NMP em dois métodos de produção de zoósporos.
NMP – Número Mais Provável, Valor máximo e Valor mínimo, quando aplicados dois métodos de produção de zoósporos: BYRT e GRANT (1979) e de CHAMBERS *et al.* (1995).

Por aplicação destes dois métodos de produção de zoósporos registou-se um aumento da taxa de produção (*TIPZ*) do método de BYRT e GRANT (1979) para o de CHAMBERS *et al.* (1995) de 93,3% para a estirpe IMI 077375 e de 97,9% para a estirpe H1000. Por outras palavras, quando se passou para o método de CHAMBERS *et al.* (1995) a rentabilidade relativa de produção de zoósporos aumentou para valores superiores a 90%.

3.3.3. Produção de Zoósporos

Dada a dificuldade de obtenção de zoósporos, sobretudo no que respeita à estirpe IMI 077375, para a escolha do método de produção de zoósporos, não foi possível recorrer a tantos ensaios como se gostaria. Seguidamente, passam-se a descrever os resultados estatísticos utilizados para avaliar uma amostra com estas características. Como as amostras não apresentavam uma distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnov, apenas os valores obtidos

para o método de Byrt e Grant seguiam uma distribuição normal) e nem eram homogêneas (teste de Levene, todas as variâncias eram significativamente diferentes) para o NMP, mesmo após terem sido transformadas, foram aplicados os testes não-paramétricos Mann-Whitney (Tabela 3-3).

Tabela 3-3 – Prova de Mann-Whitney para o tipo de isolado e para o método de produção de Zoósporos.

		Isolado		Método de Produção de Zoósporos	
		IMI 077375	H1000	BYRT e GRANT (1979)	CHAMBERS <i>et al.</i> (1995)
N		14	14	12	16
NMP de Zoósporos por mL	U de Mann-Whitney	44,000		4,000	
	W de Wilcoxon	149,000		82,000	
	Z	-2,483		-4,274	
	Sig. assimpótica (bilateral)	0,013*		0,000***	
	Sig. exacta [2x(Sig. unilateral)]	0,012*		0,000***	

Da análise da tabela anterior é possível inferir que as diferenças do NMP de zoosporos.mL⁻¹ relativamente ao tipo de isolado são estatisticamente significativas ($p < 0,05$) e ao método e produção de zoósporos são estatisticamente muito significativas ($p < 0,001$).

3.3.4. Testes de Patogenicidade

A variação da patogenicidade dos dois isolados disponíveis relativamente a *Q. suber* teve de ser avaliada. Esta é uma característica relativamente estável em relação ao agente patogénico em estudo (DUDZINSKI *et al.*, 1993), mas admite-se uma certa variação entre vários isolados de uma mesma zona geográfica (HÜBERLI *et al.*, 2001). Os isolados disponíveis provinham de zonas geográficas distintas (IMI 077375, proveniente da Europa e H1000, proveniente da Austrália) pelo que se tornava imperioso, por maioria de razão, testar as suas patogenicidades relativamente aos clones sobreiro disponíveis.

Foi, igualmente, necessário avaliar se ocorria uma relação de compatibilidade (susceptibilidade) ou de incompatibilidade (resistência) entre os clones de *Q. suber*, entretanto obtidos, e as estirpes de *P. cinnamomi*.

Infectaram-se plântulas e partes aéreas, de *Q. suber* mantidas *in vitro*, com as duas estirpes e obtiveram-se quadros sintomatológicos de infecção, designadamente: o aparecimento de micélio visível a crescer sobre o tecido vegetal, as raízes deixavam de crescer, passavam de branco-amareladas para castanho-escuro, aparecimento de necrose ao nível do primeiro nó que, em alguns casos, prosseguia até ao ápice, aparecimento de manchas necróticas cuneiformes nas

folhas, aparecimento de manchas necróticas mais ou menos dispersas pela folha (semelhante à sintomatologia relacionada com a escassez hídrica) (Fig. 3-8).

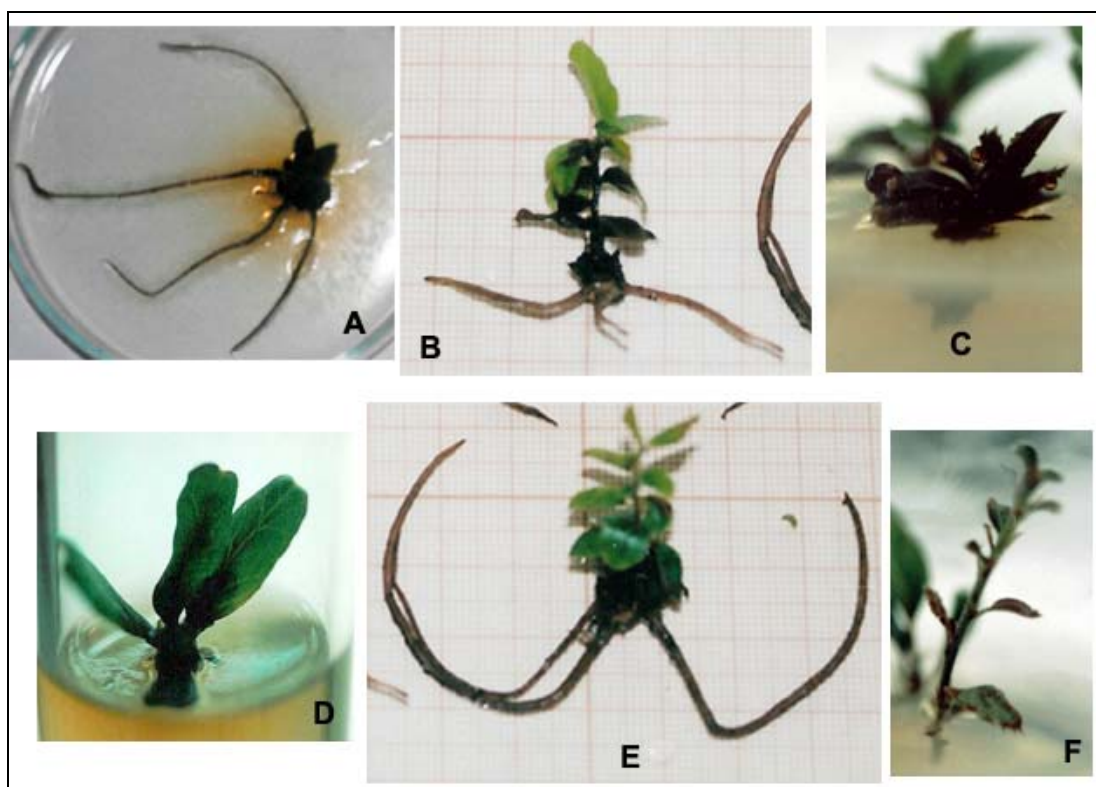


Fig. 3-8: Exemplares de *Q. suber* apresentando alguma sintomatologia associada à infecção por *P. cinnamomi*, após 7 dias de incubação.

A – Plântula infectada apresentando micélio visível, halo castanho e crescimento radicular negativo; B – Plântula infectada apresentando Primeiro, segundo e terceiro nós necróticos; C – Parte aérea infectada apresentando-se completamente necrosada e com exsudações de cor castanha; D – Parte aérea infectada apresentando nas folhas necroses cuneiformes; E – Plântula infectada apresentado o primeiro nó necrosado; F – Parte aérea infectada apresentando folhas com manchas necróticas.

Na Fig. 3-9 apresenta-se a comparação entre duas plântulas no final de sete dias de ensaio, onde uma plântula foi infectada com 10 μ L de uma suspensão de zoósporos (A) e a outra não foi infectada (B).



Fig. 3-9: Crescimento radicular negativo e positivo.

A – Plântula infectada apresentando micélio visível, halo castanho e crescimento radicular negativo; B – Plântula controle apresentado positivo.

Da observação da figura anterior é possível registrar que a planta infectada (A) apresenta micélio visível que cresce sobretudo sobre o tecido vegetal, um escurecimento generalizado da porção aérea que se prolonga desde a base até ao ápice, as raízes apresentam um escurecimento assinalável, passando de branco-amareladas para castanho-escuro, e o seu crescimento é nulo. Na planta controle (B) regista-se uma aparência saudável, com a porção aérea e radicular intactas, ressaltando-se o crescimento radicular positivo (setas) ao fim dos sete dias em que decorreu o ensaio.

Os resultados no Gráfico 3-2 descrevem as observações conduzidas por um período de 7 dias de incubação de plântulas micropropagadas de *Q. suber* com *P. cinnamomi*. Da análise do gráfico, é possível inferir que a estirpe H1000 é mais virulenta que a IMI 077375, apresentando sempre um quadro de infecção pior no que se refere aos parâmetros observados. Nos primeiros dois dias de infecção o sintoma mais relevante foi a paragem do crescimento radicular que se mantém até ao sétimo dia, tanto para a estirpe H1000, como para a estirpe IMI 077375. Nas plantas controle as raízes continuam a crescer, como é fácil comprovar a partir da Fig. 3-9.

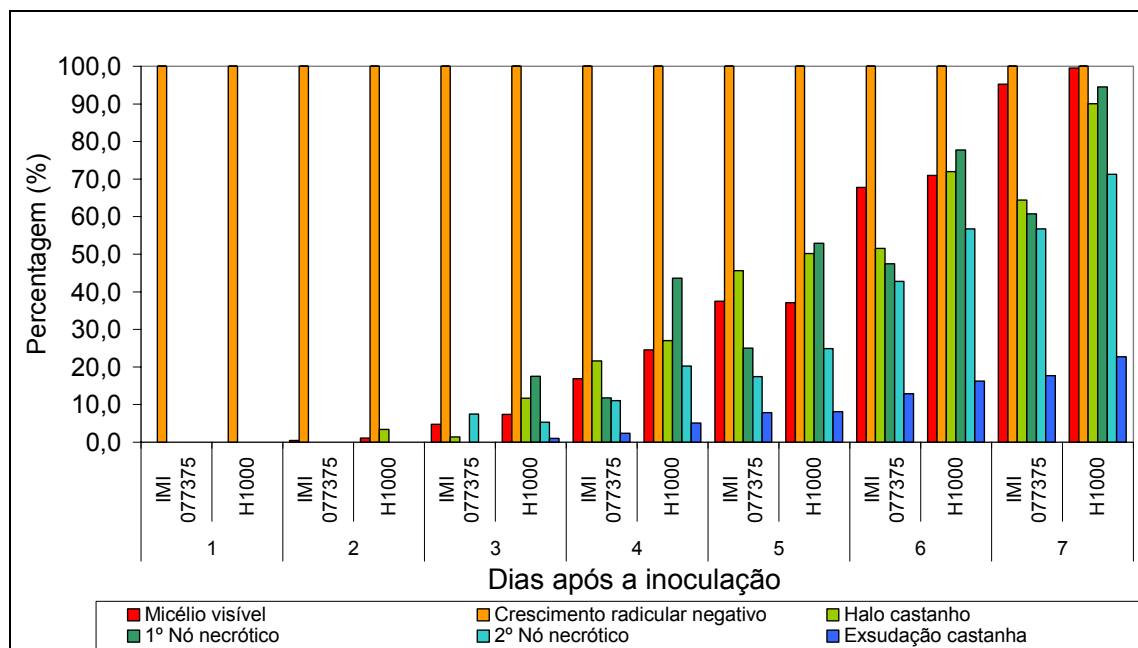


Gráfico 3-2: Observação de sintomatologia associada à infecção por duas estirpes de *P. cinnamomi* em plântulas de *Q. suber*, durante um período de 7 dias.

Para a estirpe H1000, os outros sintomas, começam a surgir a partir do segundo dia após a inoculação. Já para a estirpe IMI 077375, os outros sintomas surgem, apenas, a partir do terceiro dia.

A partir do quarto dia todos os sintomas (micélio visível, crescimento radicular negativo, halo castanho, primeiro, segundo e terceiro nós necróticos e exsudação castanha) estão presentes indiferentemente das plântulas terem sido infectadas com a estirpe H1000 ou com a estirpe IMI 077375, embora a primeira estirpe provoque um quadro sintomatológico pior.

Para os dias subsequentes o padrão continua agravando-se à medida que os dias se sucedem.

Ressaltam-se como os sintomas mais importantes, do ponto de vista da incidência, o aparecimento de micélio visível (ao fim de sete dias de incubação 100% para ambas as estirpes), do primeiro nó necrótico (ao fim de sete dias de incubação 86,8% para H1000 e 66,4% para IMI 077375) e de halo castanho (ao fim de sete dias de incubação 80,4% para H1000 e 72,1% para IMI 077375). Os restantes sintomas surgem com percentagens de 63,3 para H1000 e 59,9 para IMI 077375 de plântulas com o segundo nó necrosado e de 18,1% para H1000 e 18,0% para IMI 077375 de plântulas com exsudações negras (Fig. 3-8, pág. 128).

Na Fig. 3-10 é possível verificar o aspecto das plântulas micropropagadas controlo com ápices radiculares saudáveis de cor esbranquiçada, folhas e ápices não necróticos. As raízes apresentam-se firmes e as folhas não entram em senescência.



Fig. 3-10: Teste de patogenicidade: aspecto geral das plantas controle, após 7 dias. Notar o aspecto esbranquiçado dos ápices radiculares.

Na Fig. 3-11 é possível verificar aspecto geral das plantas inoculadas com 10 μ L de uma suspensão de zoósporos de *P. cinnamomi*, após 7 dias de incubação.

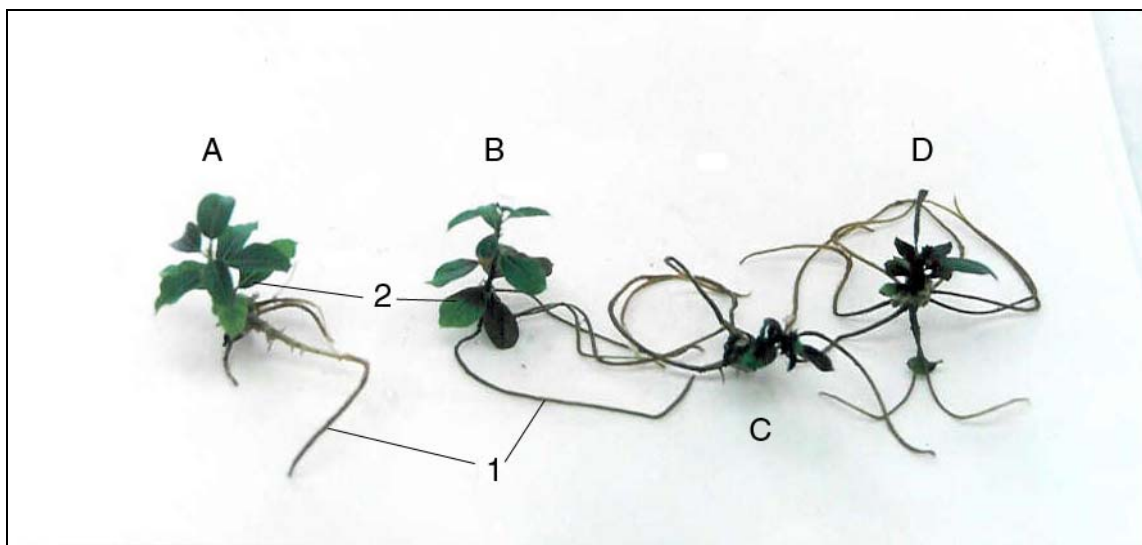


Fig. 3-11: Teste de patogenicidade: aspecto geral das plantas infectadas, após 7 dias.

A e B plântulas infectadas com a estirpe IMI 077375; B e C plântulas infectadas com a estirpe H1000. 1 – Raízes necrosadas; 2 – Primeiro nó necrótico com folhas apresentado manchas necróticas cuneiformes.

Na figura anterior é possível comprovar o aparecimento de ápices radiculares necrosados de cor castanhos-escuros, folhas com manchas necróticas ou completamente necrosadas e alguns ápices necróticos, após a incubação das plântulas com o agente patogénico. As raízes apresentam-se amolecidas e algumas folhas entram em senescência. Sublinha-se que neste

ensaio foi possível registrar o aparecimento de plântulas, infectadas com as duas estirpes, com sintomas ligeiros e severos. Os sintomas registados com a estirpe IMI 077375 são, de uma forma geral, menos intensos do que os registados com a estirpe H1000 (sintomas severos). Os sintomas ligeiros são caracterizados pelo simples aparecimento de manchas necróticas em cunha nas folhas, ao fim de 7 dias de incubação, no caso da estirpe IMI 077375, sobretudo no primeiro nó a contar da base e no caso de H1000, sobretudo no primeiro e no segundo nó a contar da base. Os sintomas severos são caracterizados pela necrose completa das folhas, que prossegue do primeiro nó até ao ápice caulinar, ao fim de 7 dias de incubação. No caso da estirpe H1000 ocorre ainda senescência das folhas, sobretudo no primeiro e no segundo nó a contar da base. Tanto nas plântulas com sintomas ligeiros, como com sintomas severos, regista-se uma progressão crescente dos sintomas da doença do ápice até à raiz.

A avaliação da presença de *P. cinnamomi*, por re-isolamento do fungo em meio V8A a 10% revelou-se positiva para raízes, base caulinar, primeiro nó, segundo nó e ápice de todas as plântulas infectadas com 10 µL da suspensão de zoósporos das duas estirpes de *P. cinnamomi*.

3.4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Por aplicação de dois métodos de esporulação (de BYRT e GRANT, 1970 e o de CHAMBERS *et al.*, 1995) às duas estirpes de *P. cinnamomi* disponíveis (IMI 077375 e H1000) foram obtidos esporângios funcionais (Fig. 3-4 e Fig. 3-5) que libertaram massas de zoósporos (Fig. 3-6 e Fig. 3-7).

As duas estirpes do agente patogénico possuíam comportamento de crescimento diferente (Fig. 3-2), verificando-se que a estirpe H1000 apresentava uma taxa de crescimento cerca de duas vezes superior ao da estirpe IMI 077375, nas mesmas condições de cultura. Quanto às restantes características morfológicas das estruturas vegetativas microscópicas das duas estirpes eram em tudo muito semelhantes não se tendo registado diferenças nas dimensões das hifas, esporângios, zoósporos ou clamidósporos. Os micélios de ambas as estirpes eram coraliformes (Fig. 3-3). As diferenças encontradas foram no crescimento do micélio vegetativo, na morfologia da colónia e na quantidade de zoósporos libertados (Tabela 3-2).

Os vários estádios de desenvolvimento foram atestados por micrografia (Fig. 3-4, Fig. 3-5, Fig. 3-6 e Fig. 3-7).

No que respeita à quantificação de zoósporos recorreu-se à técnica do Número Mais Provável (Tabela 3-2) e a dois métodos de esporulação, designadamente, os métodos de: BYRT e GRANT (1979) com uma média de produção de 137,2 ($\pm 42,1$) zoósporos por mililitro para a estirpe H1000 e de 26,2 ($\pm 12,5$) zoósporos por mililitro para a estirpe IMI 077375; CHAMBERS *et al.*

(1995) com uma média de produção de 6612,5 ($\pm 2165,6$) zoósporos por mililitro para a estirpe H1000 e de 392,5 ($\pm 285,5$) zoósporos por mililitro para a estirpe IMI 077375. O segundo método apresentou uma rentabilidade relativa superior a 90% para as duas estirpes. Os resultados referentes à aplicação do primeiro método estão em desconformidade com os obtidos pelos autores do método [$5,8 (\pm 5,6) \times 10^5$ zoósporos por mL]. BYRT e GRANT (1979) conseguiram quantidades de 10^5 zoósporos por mL, com desvios padrão de 50% do valor da média (por erros atribuídos à agregação entre os zoósporos e a diferenças substanciais entre os frascos de cultura). Por aplicação deste método não foram obtidos tais desvios padrão, contudo, nunca foram conseguidas as quantidades de 10^5 zoósporos por mL (o valor máximo provável foi de $373,3 \pm 104,1$ zoósporos por mL, para a estirpe mais produtiva – H1000). Os resultados obtidos por aplicação do segundo método ($6,6 \times 10^3 \pm 2,2 \times 10^3$ zoósporos por mL) estão em concordância com os de CHAMBERS *et al.* (1995) que obtiveram suspensões de 10^4 zoósporos por mL.

Por aplicação dos testes não-paramétricos foi possível concluir que as diferenças das médias obtidas para *Método de obtenção de zoósporos* e para o *Isolado* são estatisticamente muito significativa, isto é, a significância é inferior a 0,001. Em conclusão, o melhor método de produção de zoósporos foi o de CHAMBERS *et al.* (1995) e a estirpe mais produtiva foi H1000. Neste estudo, os ensaios de infecção subsequentes (Capítulo 4 e Capítulo 5), valeram-se sempre da estirpe H1000, como fonte de agente patogénico, e ao método de CHAMBERS *et al.* (1995) como método para produção de zoósporos.

No que respeita à interacção estabelecida entre este agente patogénico e a espécie vegetal estudada procurou-se entender se havia uma relação de compatibilidade (susceptibilidade) ou de incompatibilidade (resistência). Com este intuito, foram infectadas plântulas e partes aéreas, de *Q. suber* mantidas *in vitro*. Estes testes foram executados com as duas estirpes e obtiveram-se quadros sintomatológicos de infecção em tudo semelhantes ao que sucede em estudos de fitopatologia *in vitro* e *ex vitro*. Os sintomas incluíam o aparecimento de micélio visível a crescer sobre o tecido vegetal, as raízes deixavam de crescer, passavam de branco-amareladas para castanho-escuro, aparecimento de necrose ao nível do primeiro nó que, em alguns casos, prosseguia até ao ápice, aparecimento de manchas necróticas cuneiformes nas folhas, aparecimento de manchas necróticas mais ou menos dispersas pela folha (semelhante à sintomatologia relacionada com a escassez hídrica) (Fig. 3-8, Fig. 3-9 e Gráfico 3-2). No estudo comparado, da virulência das duas estirpes, é possível concluir que a estirpe H1000 é mais virulenta que IMI 077375. Esta virulência caracteriza-se pela consequência de um pior quadro sintomatológico (maior percentagem de plântulas com cada um dos sintomas) no que se refere aos parâmetros observados. Durante os primeiros dois dias não foi possível observar todos os sintomas supracitados, sendo de assinalar que a interrupção do crescimento radicular é o sintoma que surge mais precocemente. Todos os outros sintomas começam a surgir para a estirpe H1000 a partir do segundo dia e para a estirpe IMI 077375 a partir do terceiro dia após a inoculação. Todos os sintomas estão presentes a partir do quarto dia independentemente das plântulas terem

sido infectadas com a estirpe H1000 ou com a estirpe IMI 077375. Até ao sétimo dia o quadro sintomatológico vai piorando, progressivamente, e com mais impetuosidade para a estirpe H1000, do que para a estirpe IMI 077375.

Ao fim de sete dias, e por re-isolamento do fungo em meio V8A a 10%, todas as partes excisadas das plântulas infectadas (raízes, base caulinar, primeiro nó, segundo nó e ápice) deram resultado positivo para a presença de *P. cinnamomi*. Estes resultados foram conformes para as duas estirpes do agente patogénico (H1000 e IMI 077375).

Estes resultados estão em clara contradição com os de MONIZ *et al.* (1996) que não encontraram qualquer tipo de patogenicidade de *P. cinnamomi* para o sobreiro. As diferenças encontradas podem ser devidas às diferenças metodológicas. Assim no caso do estudo de MONIZ *et al.* (1996) as plantas envasadas de sobreiro foram inoculadas por ferida no colo com micélio proveniente de PDA, por rega com uma suspensão de micélio proveniente de PDA, ou por imersão das raízes e do colo durante 24 h numa suspensão de zoosporângios (80 por campo de ampliação 100 X)¹³ em meio de semente de cânhamo.

Se comparamos os resultados obtidos com os de CHAMBERS *et al.* (1995) para plântulas micropropagadas de *Castanea sativa*, as similitudes são maiores. Para este sistema, os autores verificaram o aparecimento de pequenas lesões ao longo da raiz a partir do primeiro dia subsequente à inoculação. Já no que se refere às lesões do caule, foram registadas a partir do terceiro dia após a inoculação. Para este sistema a morte da plântula surgia ao quarto dia (CHAMBERS *et al.*, 1995). Todavia, deverá sublinhar-se que, efectivamente, há um ligeiro retardamento do aparecimento dos sintomas de cerca de 3 dias para *Quercus suber* (a morte da planta, com o sistema radicular e a porção caulinar totalmente necróticos, surge a partir do sétimo dia, para as duas estirpes estudadas) e que, por isso, se poderá considerar esta espécie mais resistente, ou preferivelmente, menos susceptível que *Castanea sativa*.

Em nenhum ensaio foram obtidas plântulas de *Q. suber* totalmente resistentes a *P. cinnamomi*.

¹³ Este dado apresentado pelos autores supracitados parece incongruente, pois que, se atentarmos as Fig. 3-4, Fig. 3-5 e Fig. 3-6, que apresentam micrografias de zoosporângios a ampliações de 20, 40 e 100 X, respectivamente, facilmente se percebe que seria uma impossibilidade conter num campo de ampliação 100 X a quantidade de 80 zoosporângios. De referir ainda que segundo Erwin e Ribeiro (1996) os zoosporângios de *P. cinnamomi* possuem dimensões médias de 75 x 40 µm (comprimento x largura). Portanto, a área aproximada para conter cerca de 80 zoosporângios teria de ser cerca de 2,4 x 10⁵ µm² (ou 0,24 mm²).

4. AVALIAÇÃO DA INTERACÇÃO NO SISTEMA DE CULTURA DE TECIDO CALOSO

4.1. INTRODUÇÃO

Em fitopatologia, alguns investigadores, vêm estudando a hipótese da possibilidade da escolha de sistemas de culturas *in vitro* para avaliar a interacção entre parasitas e hospedeiros. Os relatos deste estudos vêm sendo publicados desde pelo menos a década de 70. Num artigo de revisão, ŠVÁBOVÁ e LEBEDA, em 2005, apresentam as possibilidades de selecção *in vitro* no melhoramento de plantas resistentes aos agentes patogénicos produtores de toxinas.

4.1.1. Culturas de tecidos calosos/fitopatologia

Em 1972, 1987 e 1995 HELGESON *et al.*, MILLER e SINHA (respectivamente) sintetizaram as metodologias, aplicações, vantagens e desvantagens das culturas de tecido caloso/agente patogénico. Seguidamente, enumeram-se as vantagens na utilização do tecido caloso para o estudo dos mecanismos de resistência considerados por estes autores:

- os mecanismos de resistência são expressados em células similares do ponto de vista morfológico e fisiológico. A complexidade da planta intacta e assim as diferenças fisiológicas podem ser evitadas.
- a complicação da interacção com organismos contaminantes é eliminada.

- o material hospedeiro pode crescer sob condições definidas e repetíveis.
- a resposta de resistência do tecido do genótipo resistente pode variar desde altamente susceptível a resistente por modificação da morfologia do tecido (tecido caloso solto versus firme) ou por modificação do regime hormonal resistência a este fungo específico parece ser um factor monogénico, e assim a expressão de genótipo resistente pode ser mais fácil para elucidar do que a resistência multigénica (HELGESON *et al.*, 1972; MILLER, 1987; SINHA, 1995).

A expressão da resistência e da susceptibilidade *in vitro* dependem de parâmetros que incluem a temperatura, luminosidade, concentração de *inoculum*, morfologia do tecido caloso e tipo e concentração de fitorreguladores no meio de cultura (MILLER, 1987; SINHA, 1995). As aplicações deste tipo de culturas passam por: produção em assepsia de culturas de parasitas obrigatórios; estudo do processo de infecção; indução de esporulação nos fungos; expressão da resistência em culturas de calos; estudo da infecção em plantas intactas *in vitro*; testes de fitofármacos para o controlo de doenças; produção de fito-alexinas; detecção de *inoculum* de ocorrência interna na semente (SINHA, 1995). Por outro lado, certos fungos patogénicos facultativos, como sejam espécies dos géneros *Alternaria*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Phytophthora* e *Pyricularia* perdem a agressividade ao longo das subculturas em meio sintético. Por esse motivo para assegurar a virulência antes da inoculação, por vezes, é necessário recorrer à cultura do fungo com o hospedeiro *in vitro* (SINHA, 1995).

Em 1972, HELGESON *et al.*, apresentavam um sistema de cultura de tecidos para o estudo resistência a *Phytophthora parasitica*. Ainda na década de 70, HELGESON *et al.* (1976), estudaram o gene de resistência de plantas de tabaco em culturas de tecidos, HABERLACH *et al.* (1978) estudaram a alteração da resistência pela presença de citocininas e CHEN *et al.* (1979) o crescimento fúngico em cultura de tecido caloso. Ainda em 1978, MARONEK e HENDRIX obtiveram culturas de tecido caloso a partir de plantas resistentes e susceptíveis de *Nicotiana tabacum* que infectaram com *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (raça 0 e 1). O método aplicado revelou que as culturas mostravam a resistência ou a susceptibilidade das plantas que lhe deram origem (MARONEK e HENDRIX, 1978).

Na década de 80 registam-se os estudos de de ZOETEN *et al.* (1982), sobre infecção de tecido caloso de tabaco por *P. parasitica*, DEATON *et al.* (1982) sobre a resistência a *P. parasitica* em culturas de tecido caloso de tabaco, PEROS e CHAGVARDIEFF (1983) sobre a toxicidade de *Ustilago scitaminae* sobre tecido caloso de cana-de-açúcar e MILLER *et al.* (1984) sobre susceptibilidade e resistência de tecido caloso infectado com *P. megasperma*. Mais tarde, McCOMB *et al.* (1987) estudaram a expressão da resistência de campo em tecido caloso de várias espécies inoculado com *P. cinnamomi* e JANG e TAINTER (1990) estudaram a resposta de tecido caloso de *Pinus* infectado com *Phytophthora cinnamomi*.

Nos estudos de HELGESON *et al.* (1972) foram realizadas culturas de tecido caloso de *Nicotiana tabacum* a partir plantas susceptíveis e plantas resistentes a *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (Ppn). O tecido originado a partir de plantas resistentes eram menos colonizado do que o das plantas susceptíveis. Chegaram à conclusão que o sistema de cultura de tecido caloso de *N. tabacum*-Ppn parecia adequado para estudar a natureza da resistência à doença sob condições estritamente controladas. Os regimes luminosos tentados não afectaram a interacção.

Em 1987, McCOMB *et al.*, afirmaram que a correlação entre a resposta de resistência do tecido caloso e da planta intacta sugeria que um método de triagem calo-fungo podia ser útil para seleccionar, das áreas livres da doença, árvores com qualidades superiores do ponto de vista da exploração florestal.

Num outro estudo, HELGESON *et al.* (1976) obtiveram tecido caloso resistente a partir de plantas resistentes e tecido caloso susceptível a partir de plantas susceptíveis. Infectaram culturas de tecido caloso de *Nicotiana tabacum* com *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (Ppn). O factor genético, único, dominante que conferia resistência à doença em plantas intactas era expressado em culturas de tecido caloso (HELGESON *et al.*, 1976).

De referir, ainda, que HELGESON *et al.* (1976) afirmaram terem sido feitas várias tentativas de utilização do sistema das culturas de tecidos para estudar a interacção hospedeiro-parasita com resultados muito limitados e que ao seu conhecimento, este era o primeiro teste directo se um gene de resistência à doença na planta intacta é também expressado em culturas de tecidos. Chegaram à conclusão que o sistema de cultura de tecidos parecia ser um sistema útil e válido para o estudo de acontecimentos moleculares associados com a expressão do gene da resistência (HELGESON *et al.*, 1976).

MILLER *et al.* (1984) obtiveram tecidos calosos de *Medicago sativa* a partir de plantas resistentes e susceptíveis e infectaram-nos com *Phytophthora megasperma* var. *medicaginis*. Os clones manifestavam a resistência e a susceptibilidade das plantas que lhe deram origem: a resistência era manifestada pelo limitado crescimento e; a susceptibilidade pelo crescimento abundante crescimento das hifas sobre o tecido caloso (MILLER *et al.*, 1984). Os clones resistentes quando infectados com *Phytophthora megasperma* var. *glycinae* (combinação de não hospedeiro) eram mais limitadamente colonizados do que quando eram infectados com Pmm. Em todas as interacções o tecido caloso mudava de cor em 3 dias, nos tecidos calosos resistentes e não-hospedeiros a mudanças de cor era maior e mais castanho-escuro do que no tecido caloso susceptível. Os resultados deste estudo mostram que com condições de cultura cuidadosamente controladas, a resistência genética a Pmm é expressada em tecido caloso de *Medicago sativa* e que o sistema de cultura de tecidos pode ser adequado para o exame dos factores que influenciam a expressão da resistência à doença em *Medicago sativa* (MILLER *et al.*, 1984).

McCOMB *et al.* (1987) produziram tecido caloso de várias espécies nativas e hortícolas da Austrália com vários graus de resistência no campo a *Phytophthora cinnamomi*. Fizeram a

triagem para a expressão da resistência a *P. cinnamomi*. A extensão do crescimento das hifas foi correlacionada com o comportamento da planta a partir da qual o tecido caloso foi derivado e observaram a quantidade de calose formada e a extensão do escurecimento do tecido caloso. As principais conclusões deste estudo foram: a resistência e a susceptibilidade ao agente patogénico fúngico foram expressadas no tecido caloso; a resistência manifestava-se por crescimento limitado e escasso do fungo sobre o tecido caloso; a susceptibilidade por crescimento prolífico e aéreo; a correlação entre a resposta no tecido caloso e a resistência no campo de *E. marginata*, sugere que um método de triagem tecido caloso-fungo podia ser usado para seleccionar, em áreas livres da doença, árvores, com qualidade superior, que pudessem ser resistentes a *P. cinnamomi*; a concentração dos reguladores de crescimento, no meio de cultura, alterava a morfologia dos tecidos calosos, assim como o grau de crescimento fúngico (McCOMB *et al.*, 1987).

Em Portugal os estudos de SEABRA e PAIS (1993 e 1999) são um exemplo da utilização das culturas *in vitro* para a obtenção de clones de *Castanea sativa* resistentes a *Phytophthora cinnamomi*.

4.1.2. Reguladores de Crescimento

O tipo de reguladores de crescimento vegetal bem como da sua importância na indução e manutenção das culturas *in vitro* foram discutidos no capítulo 2. Importa nesta altura fazer referência à sua importância no intrincado processo de infecção com o agente patogénico *Phytophthora cinnamomi*.

4.1.3. Importância dos Reguladores de Crescimento no Processo de Infecção

A colonização diferencial das culturas pode ser influenciada por factores como a temperatura, a concentração de *inoculum*, o tipo morfológico do tecido caloso, o conteúdo em reguladores de crescimento do meio de cultura, o genótipo do tecido caloso e do agente patogénico (HELGESON *et al.*, 1972).

Nos sistemas planta-agente patogénico onde há indução de tumorização, o IAA, como promove a actividade cambial, contribui para a formação dos tumores e, por outro lado, pode actuar como um factor de virulência (SURICO, 1986). Em alguns sistemas fitopatogénicos as citocininas parecem contribuir como determinantes secundários (SURICO, 1986), contudo diversos estudos comprovam a forte influência deste regulador de crescimento na evolução dos

sintomas provocados por determinados agentes patogénicos (HELGESON *et al.*, 1972; HABERLACH *et al.*, 1978; MILLER *et al.*, 1984; McCOMB *et al.*, 1987; JANG e TAINTER, 1991).

HABERLACH *et al.* (1978) estudaram os diferentes efeitos das concentrações de auxina e citocinina na resistência de *Nicotiana tabacum* em tecido caloso a *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*: os tecidos originados a partir de cultivares resistentes exibiam resposta hipersensível aos zoósporos do fungo e eram apenas fracamente colonizados; os tecidos de cultivares susceptíveis ou de cultivares resistentes com níveis de citocinina (BAP e K) elevados eram fortemente colonizados. Neste estudo, a Z e o 2ip eram menos eficientes na eliminação da resposta hipersensível e da resistência do clone e aumentos no IAA invertiam os efeitos das citocininas. Para estes autores, aparentemente, o balanço dos reguladores de crescimento controlava a resposta do hospedeiro ao fungo: controlando a concentração das citocininas podiam ser obtidas tanto reacções de resistência como de susceptibilidade com a mesma combinação de genótipo do hospedeiro e de raça do fungo (HABERLACH *et al.*, 1978).

Em 1984, MILLER *et al.*, verificaram, que a concentração da cinetina influenciava a expressão da resistência: com menores concentrações de cinetina os tecidos calosos tornavam-se menos consistentes e, por isso, mais susceptíveis ao ataque por *Phytophthora megasperma* var. *megasperma* e *Phytophthora megasperma* var. *glycinea*.

Em 1987, McCOMB *et al.*, concluíram que na interacção *Phytophthora cinnamomi* e algumas plantas hortícolas e nativas australianas, a concentração dos reguladores de crescimento, no meio de cultura, alteravam a morfologia dos tecidos calosos, assim como o grau de crescimento fúngico.

Em 1991, JANG e TAINTER, realizaram uma experiência na qual compararam os melhores meios nutritivos, temperaturas e reguladores de crescimento, para a indução de tecido caloso e crescimento de várias espécies de pinheiro (sementes de diferentes proveniências) com o seu efeito no crescimento de *Phytophthora cinnamomi*. Estes autores chegaram à conclusão que as condições ideais de expressão de resistência diferencial dos tecidos calosos, quando inoculados com hifas de *P. cinnamomi*, eram: meio de Murashige e Skoog, com 10^{-5} M de 2,4-D, a 26° C. A concentração elevada de 2,4-D (5×10^{-5} M) inibia o crescimento de *P. cinnamomi* (JANG e TAINTER, 1991).

4.1.4. Alterações Estruturais e Ultraestruturais

de ZOETEN *et al.* (1982) analisaram, por microscopia electrónica de transmissão e de varrimento, a resposta de tecido caloso de *Nicotiana tabacum* à inoculação com *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. Três horas após a inoculação os zoósporos tinham enquistado e germinado e o tubo germinativo penetrava as células do tecido caloso. 24 horas após a infecção

nos clones resistentes manifestavam-se respostas hipersensíveis, típicas de combinações incompatíveis, onde quase a totalidade das células da área hipersensível tinham colapsado. No tecido caloso susceptível, registava-se uma combinação compatível, onde as células permaneciam túrgidas. 48 horas após a inoculação na combinação compatível as hifas tinham penetrado cerca de 50 camadas de células, enquanto que na combinação incompatível o crescimento do fungo estava limitado a 5-8 camadas de células (de ZOETEN *et al.*, 1982).

Em 1990, JANG e TAINTER registaram uma expressão diferenciada da resistência do tecido caloso de *Pinus* relativamente a *Phytophthora cinnamomi*. Estes autores produziram tecido caloso a partir de espécies resistentes e susceptíveis e encontraram diferenças ao nível celular por observações em microscopia óptica e electrónica (transmissão e varrimento). As espécies resistentes apresentavam pouca penetração das hifas, maior acumulação de materiais de densidade electrónica (possivelmente de natureza fenólica) e alterações morfológicas ao nível da parede (JANG e TAINTER, 1990). Segundo estes autores, por não terem sido encontradas reacções de incompatibilidade anatómicas, os mecanismos fisiológicos e bioquímicos pareciam regular a resistência de *Pinus* relativamente a *P. cinnamomi*, em vez dos mecanismos físicos (JANG e TAINTER, 1990).

4.1.5. Resistência e Susceptibilidade

Os conceitos de resistência e susceptibilidade são centrais na patologia vegetal e foram revistos por WALTON (1997). Assim quando um microrganismo particular conseguir causar doença numa determinada planta, diz-se que essa planta é susceptível (uma planta susceptível a um determinado agente patogénico não é, necessariamente, susceptível a um outro) e quando um microrganismo não conseguir causar doença numa determinada planta, diz-se que essa planta é resistente (raras são as plantas em que um único gene de resistência consegue controlar a invasão por dois tipos de agentes patogénicos) (WALTON, 1997). Nestes dois conceitos estão inerentes os conceitos de reacção de compatibilidade e incompatibilidade. A compatibilidade está relacionada com os sintomas relacionados com a susceptibilidade à doença e a incompatibilidade com situações nas quais a doença não ocorre (ou porque a planta é resistente ou porque o microrganismo não é patogénico) (WALTON, 1997).

As interacções entre as plantas e os agentes patogénicos podem ser alteradas em favor da planta ou do agente patogénico por pequenas alterações no ambiente, fundamentalmente na temperatura e no estado nutritivo da planta, o que levanta dificuldades quanto a saber se é a planta ou o agente patogénico a ser afectado pela mudança no ambiente (ELLINGBOE, 2001). O estado de desenvolvimento de uma planta pode afectar a resistência ou a susceptibilidade a um determinado agente patogénico. Uma planta pode ser susceptível a um determinado agente patogénico numa determinada fase do seu desenvolvimento e resistente noutra fase

(ELLINGBOE, 2001). O ponto de vista das hipóteses gene-por-gene como uma relação de um-para-um não é suportado por experiências que questionam se os genes de avirulência e os genes de resistência funcionam sozinhos (ELLINGBOE, 2001). O termo genómico tem sido interpretado de diferentes formas, mas o seu impacto mais útil nos estudos das interacções entre hospedeiros e agentes patogénicos irá ser, provavelmente, encontrar todas as peças do puzzle de como é que as plantas e os agentes patogénicos comunicam (ELLINGBOE, 2001).

A maioria das reacções de defesa dependem da via fenilpropanóide e culminam na lenhificação da parede celular e não se tornam evidentes mesmo depois do contacto subsequente com um agente patogénico desafiador, mesmo que não relacionado (GOZZO, 2004).

As pesquisas no âmbito da fitopatologia foram sobretudo impulsionadas pela necessidade, cada vez maior, de se obterem soluções racionais de combate aos agentes patogénicos que atacam as plantas agrícolas. As soluções racionais incluem a utilização de produtos adequados, que venham substituir a utilização tradicional de pesticidas, em favor de produtos abiocidas, atóxicos e de custo reduzido. Em 2004, GOZZO, resumiu os avanços mais recentes neste combate, num trabalho intitulado "Systemic acquired resistance in crop protection". Neste trabalho o autor defende a possibilidade de se induzir resistência sistémica adquirida em plantas agrícolas pela utilização de agentes químicos que notadamente copiam o modo de acção do ácido salicílico. Entre esses agentes químicos este autor destacou os produtos conseguidos artificialmente como o ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA), o benzotriazole (BTH, metil-s-acibenzolar, nome comercial Bion 50 WG), o ácido β -aminobutírico (BABA, aminoácido sintético, não proteico), o 3-aliloxi-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido (PBZ, probenazole, precursor da sacarina), o ácido 2,2-dicloro-3,3-dimetilciclopropanocarboxílico (DDCC) e 2,2-dicloro-N-[1-(4-clorofenil)etil]-1-etil-3-metilciclopropanocarboxiamida (carpropamida, nome comercial ARCADO[®] 150 e ARCADO[®] 300) e os produtos de origem natural, tais como a riboflavina e o quitosano. Estes produtos são citados pelo autor na luta contra doenças como o oídio, o míldio, assim como, doenças provocadas por fungos e bactérias necrotróficas, em plantas agrícolas. Estes activadores químicos das plantas deverão ser menos susceptíveis de gerar resistências por parte dos agentes patogénicos, uma vez que a resistência sistémica adquirida trata-se de um sistema multigénico, contudo alguns estudos mostraram efeitos contraproducentes, tais como, interacções negativas com ataques simultâneos com insectos, nanismo, diminuição da produção de sementes, ou produção de alergénios alimentares (GOZZO, 2004). O aperfeiçoamento deste método, provavelmente, está dependente da descoberta de um indutor ideal da resistência sistémica adquirida que active apenas os genes relacionados com a defesa a um agente patogénico sem induzir efeitos colaterais (GOZZO, 2004). É de supor que as descobertas e os aperfeiçoamentos neste campo, mais tarde ou mais cedo, venham a ser aplicadas na protecção das plantas florestais, sobretudo, naquelas com interesse económico.

4.2. METODOLOGIA

4.2.1. Triagem de Clones Resistentes e Susceptíveis

Procedeu-se à triagem, entre os clones disponíveis (de proveniências diferentes e de natureza jovem ou adulta diferente), para verificar a existência de clones “susceptíveis” e “resistentes”. O tecido caloso foi mantido no meio descrito no capítulo 2, durante 4 semanas numa estufa a $22^{\circ}\text{C} \pm 1$, sempre sob condições de escuridão. Findo este período procedeu-se ao método de inoculação. As culturas infectadas com zoósporos e as culturas controlo foram mantidas na escuridão, numa estufa a $22^{\circ}\text{C} \pm 1$, durante 7 dias. Durante o período de incubação procedeu-se à cotação do crescimento fúngico diariamente.

4.2.3. Métodos para Obtenção de Zoósporos

Para produção de zoósporos procedeu-se segundo os métodos de Gees e Coffey modificado (citado por CHAMBERS *et al.*, 1995) pela substituição do extracto de solo por solução de Chen e Zentmyer modificada (ver Capítulo 3). A estirpe escolhida foi a mais virulenta, ou seja, a estirpe H1000 (ver Capítulo 3).

4.2.4. Método de Inoculação

Para o tecido caloso, procedeu-se colocando na zona central, um disco (3 mm de diâmetro) de papel de filtro estéril (Fig. 4-1). O disco é inoculado com 10 μL da suspensão de zoósporos e funciona como ponto de referência da origem da inoculação. Procedeu-se da mesma forma para o controlo, substituindo a suspensão de zoósporos por água destilada estéril. As culturas assim preparadas foram mantidas numa estufa a $22^{\circ}\text{C} \pm 1$, sempre sob condições de escuridão.



Fig. 4-1: Colocação na zona central da massa de tecido caloso, de um disco (3 mm de diâmetro) de papel de filtro estéril.

4.2.5. Quantificação da Densidade de *Inoculum*

Como método de contagem directa, recorreu-se à contagem dos zoósporos num hematocitómetro (Bright-Line® da Sigma). O ajuste da quantidade de zoósporos pode ser conduzido por diluição com água destilada estéril ou concentração por filtração em membrana de 0,45 µm. Nos ensaios referidos neste estudo, apenas se procedeu ao ajuste da quantidade de zoósporos por diluição. Simultaneamente, procedia-se ao método de contagem indirecta, pela técnica do Número Mais Provável (NMP). Estimou-se o NMP, com séries de 5 tubos, usando caldo V8 a 1% (Capítulo 3).

4.2.6. Recolha do Material Biológico

Após o procedimento de inoculação e incubação recolheram-se amostras do tecido caloso infectado e não infectado. A recolha das amostras foi conduzida após sete dias de inoculação em duas zonas distintas (Fig. 4-2): Zona 1 – sensivelmente a 2 cm do local de origem da inoculação; Zona 2 – na periferia de crescimento do tecido caloso (sensivelmente a 5 cm do local de origem da inoculação).

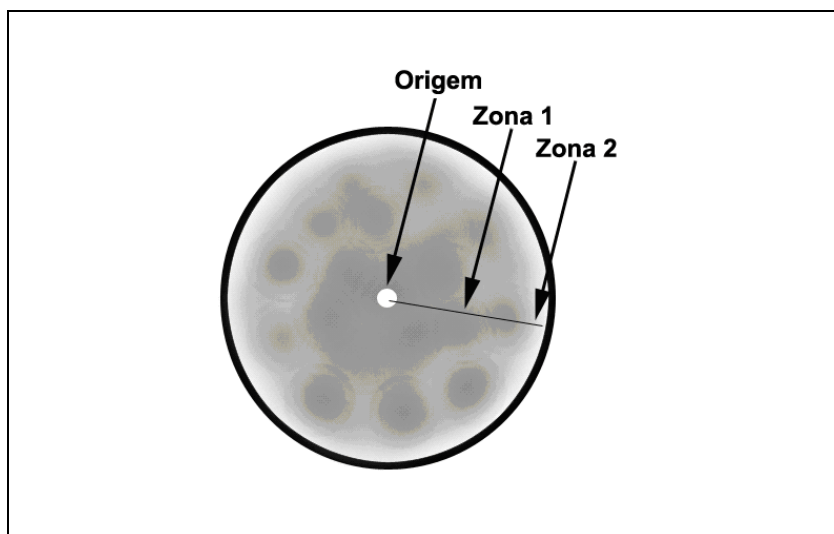


Fig. 4-2: Esquema representativo da recolha das amostras em três zonas distintas
Origem – 0 cm; Zona 1 \approx 2 cm; Zona 2 \approx 5 cm.

4.2.7. Fixação do Material Biológico para Observação por Microscopia Electrónica de Transmissão (MET)

As amostras de cada zona foram fixadas durante 120 minutos em glutaraldeído a 2,5% (v/v) em PIPES 0,1 M {[ácido de Piperazina-1,4-bis(2-etanosulfónico)] tamponado com NaOH até pH 7,0}. Seguiram-se três lavagens, durante 10 min., no tampão PIPES. A fixação foi supervisionada num microscópio estereoscópico. A pós-fixação foi em tretóxido de ósmio a 1% em tampão PIPES (a 2%, pH 7,0) seguida de lavagem com água destilada.

Procedeu-se, então, à desidratação numa série ascendente de graduações de etanol (entre 50-100%, sendo repetida a última série), assim: 15 min. em álcool a 50 %; 15 min. em álcool a 70 %; 15 min. em álcool absoluto e; 15 min. em álcool absoluto.

O material foi então transferido para óxido de propileno durante 15 min.. Este passo foi repetido por mais 15 min. em óxido de propileno renovado. A impregnação foi conduzida em misturas sucessivas de óxido de propileno:resina de epoxi (3:1, 1:1 e 1:3, e 0:4), assim: 15 min. em mistura de óxido de propileno:EPON[®] 812 (3:1); 45 min. em mistura de óxido de propileno:EPON[®] 812 (1:1); 45 min. em mistura de óxido de propileno:EPON[®] 812 (1:3) e; 2 a 3 h em resina epoxi (EPON[®] 812).

Cada amostra foi acondicionada e orientada numa cápsula de gelatina e a polimerização ocorreu numa estufa a 40°C *overnight* (aproximadamente 12 horas). A resina endureceu por secagem a 60°C durante 2 a 3 dias, tornando-se num plástico sólido e transparente. O tecido tinha

a mesma consistência que o plástico envolvente; os blocos podiam então ser moldados e seccionados com facilidade.

Numa primeira fase os blocos foram talhados e fizeram-se cortes semi-finos, que foram corados com azul de toluidina, com o intuito de localizar zonas de interesse. Os blocos foram então, novamente, talhados e foram cortadas secções ultrafinas de tecido, entre 95 a 130 µm, num micrótomo (Leica, Reichert SuperNova, Alemanha) com faca de diamante. As secções foram então colocadas sobre grelhas, incubadas em citrato de chumbo e lavadas durante 2 a 3 min.. Passou-se à incubação em acetato de uranilo, lavagem (2x) e secagem. A secções foram, então, examinadas num microscópio electrónico de transmissão HITACHI H9000 – NAR a 100 KV.

4.2.8. Recolha e Tratamento dos Dados

Após a inoculação das culturas, e durante sete dias, procedeu-se à contabilização do crescimento fúngico, por aplicação do método descrito por HELGESON *et al.* (1972). As culturas foram, então, avaliadas relativamente ao grau de crescimento fúngico estabelecendo como critério de pontuação os seguintes parâmetros: 0 – micélio não visível; 1 – algum micélio aéreo; 2 – crescimento localizado; 3 – colonização moderada; 4 – colonização extensiva; 5 – tecido caloso envolvido numa manta micelial. Para determinar a cotação do crescimento fúngico em cada dia de incubação recorreu-se à fórmula:

$$CCF = \frac{(N_0 \times 0 + N_1 \times 1 + N_2 \times 2 + N_3 \times 3 + N_4 \times 4 + N_5 \times 5)}{NT}, \text{ onde}$$

CCF - Cotação do Crescimento Fúngico

N_n - Número de tecidos com a pontuação n (igual a 0, 1, 2, 3, 4 ou 5)

NT - Número Total de tecidos ensaiados

A quantificação do crescimento do tecido caloso foi obtida recorrendo à fórmula:

$$IPFTC = \left(\frac{P_f - P_i}{P_f} \right) \times 100, \text{ onde}$$

IPFTC é o incremento do peso fresco do tecido

P_f é o peso final (ao fim dos 28 dias de crescimento) e

P_i é o peso inicial (dia de inoculação).

Antes de serem aplicados os testes estatísticos procedia-se à verificação da normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e à homogeneidade das variâncias (teste de Levene) no sentido de saber se era possível aplicar o teste paramétrico ou o não-paramétrico. Como as amostras não

preenchem os requisitos para aplicação dos testes paramétricos (mesmo após transformação), recorreu-se ao teste ANOVA em ordens a Kruskal-Wallis (teste não-paramétrico.)

O limite de confiança aceite foi igual ou superior a 95%. Na avaliação do nível de significância o valor de p pode ser classificados em quatro grupos: sem significância; com significância entre 0,05 e 0,01; com significância entre 0,01 e 0,001 e; maior que 0,001. Assim de acordo com o representado na Tabela 4-1, temos:

Tabela 4-1: Correspondência do nível de significância com o resultado do teste estatístico e com a sinalética utilizada na apresentação de resultados.

Valor de p	Resultado do teste	Comentário	Sinalética
Maior que 0,05	Aceitar a Hipótese Nula (H_0)	Não há evidências para rejeitar H_0	NS
Entre 0,01 e 0,05	Rejeitar H_0 (Aceitar H_1)	Há algumas evidências para rejeitar H_0 (por isso aceitar H_1)	*
Entre 0,001 e 0,01	Rejeitar H_0 (Aceitar H_1)	Há uma forte evidência para rejeitar H_0 (por isso aceitar H_1)	**
Menor que 0,001	Rejeitar H_0 (Aceitar H_1)	Há uma evidência muito forte para rejeitar H_0 (por isso aceitar H_1)	***

Nas tabelas onde são apresentados os testes estatísticos a sinalética “NS” corresponde a não significativo, “*” pouco significativo, “**” significativo e “***” muito significativo.

4.3 RESULTADOS

4.3.1. Avaliação Qualitativa da Invasão Fúngica Sobre Tecido Caloso

A cotação do crescimento micelial sobre os tecidos calosos foi obtida por aplicação do método descrito por HELGESON *et al.* (1972), sendo atribuído o valor 0 quando não era visível qualquer micélio, o valor 1 quando era possível avistar algum micélio aéreo, o valor 2 quando era observável o crescimento localizado do agente patogénico, o valor 3 quando ocorria colonização moderada, o valor 4 quando a colonização era extensa e, finalmente, o valor 5 quando o tecido caloso ficava envolvido por uma manta micelial.

Os vários clones foram testados contra suspensões de zoósporos de *P. cinnamomi*. Na Fig. 4-3 apresentam-se várias gradações de crescimento fúngico sobre esses tecidos, passados sete dias de incubação, com 10 μ L de uma suspensão zoósporos do agente patogénico.

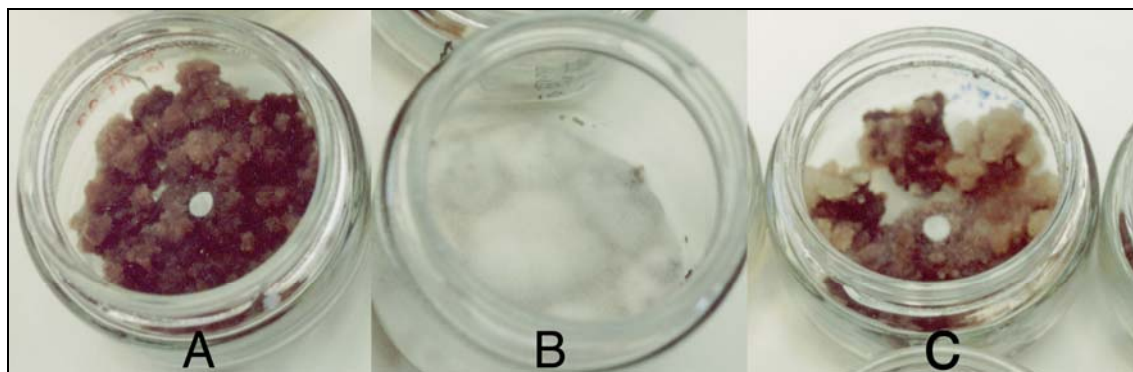


Fig. 4-3: Aspecto de várias gradações de crescimento fúngico em clones diferentes.
A – Escurecimento completo do tecido, pouco micélio aéreo; B – Tecido caloso completamente revestido por tapete micelial; C – Escurecimento parcial do tecido caloso, pouco micélio aéreo.

Da figura anterior é possível depreender a existência de tipos muito distintos de invasão fúngica. Os sintomas vão desde o escurecimento parcial do tecido caloso e nenhum ou pouco micélio aéreo, passando pelo escurecimento completo do tecido e pouco ou algum micélio aéreo até tecidos completamente revestidos por um tapete micelial.

4.3.2. Triagem de Clones “Susceptíveis” e “Resistentes”

Procedeu-se à triagem entre os clones disponíveis (de proveniências diferentes e de natureza jovem ou adulta diferente) para verificar a existência de clones “susceptíveis” e “resistentes”. Na avaliação do crescimento fúngico sobre o tecido caloso é importante utilizar exemplares que sejam comparáveis em termos de textura (McCOMB *et al.*, 1987). A escolha dos clones para esta triagem teve os seguintes critérios de inclusão: o crescimento do tecido caloso teria de ser do tipo rápido e homogéneo, isto é, ao fim de 4 semanas de crescimento a totalidade da superfície de agar teria de estar homogeneamente recoberta; o tecido caloso deveria possuir uma consistência friável, densa e não demasiadamente compacta. Estes critérios excluíram a grande totalidade dos clones de Trás-os-Montes e de natureza adulta (cuja consistência dos tecidos calosos era compacta e o crescimento lento e não homogéneo). Os clones da região de Aveiro eram medianamente susceptíveis. De entre os clones que respeitavam os critérios de inclusão distinguiram-se dois: o clone 702 é um clone de natureza jovem e cuja origem é de Montemor-o-Novo e o clone 484 é um clone, também, de natureza jovem, mas cuja origem é de Ponte-de-Sôr.

No Gráfico 4-1 estão representados os valores para a cotação do crescimento fúngico em dois clones: 702 e 484 ao fim de sete dias de incubação com 10 µL da suspensão de zoósporos *P. cinnamomi*.

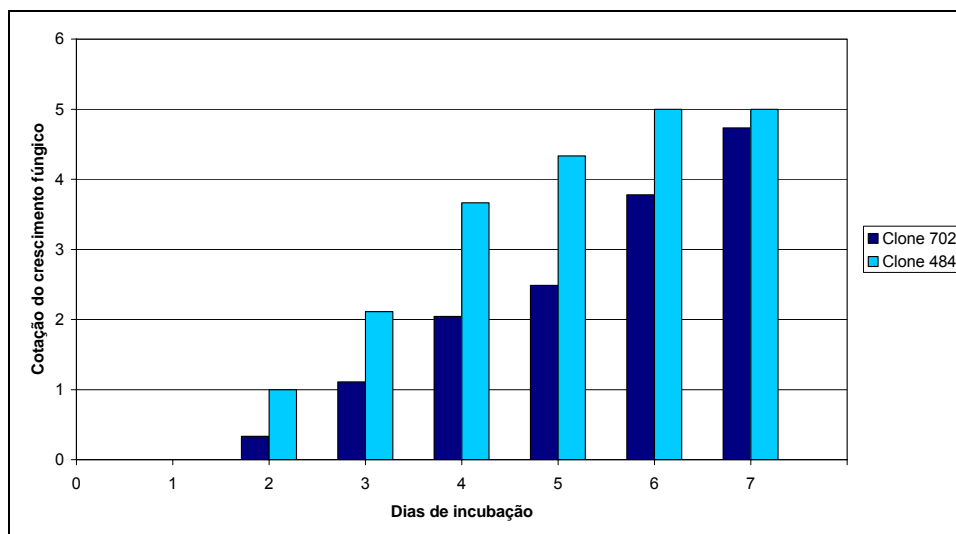


Gráfico 4-1: Representação dos valores para a cotação do crescimento fúngico em dois clones: 702 e 484 ao fim de sete dias de incubação com *P. cinnamomi*.

Da análise do gráfico anterior é possível inferir que o clone 484 apresenta sintomas de infecção muito mais precocemente do que o clone 702 (ao fim de 6 dias de incubação atinge o valor máximo de cotação do crescimento fúngico, 5,00). No clone 702, o crescimento fúngico, ao fim de sete dias de incubação, não chega a atingir o máximo de cotação, ficando-se pelo valor de 4,73. De registar, ainda, que ao longo do tempo a cotação do crescimento fúngico para o clone 702 é cerca de metade da do clone 484, com a excepção dos dois últimos dias. Importa, ainda, fazer uma referência à qualidade do crescimento fúngico sobre os tecidos calosos ao fim dos setes dias de incubação. Após a inoculação registava-se uma variação de cor de amarelo claro para castanho-escuro no tecido caloso infectado pelas suspensões de zoósporos. Associada à infecção surgia uma auréola castanha na superfície de agar que estava em contacto íntimo com o tecido.

A existência de clones verdadeiramente resistentes, isto é, nos quais não ocorria qualquer invasão fúngica, não foi verificada, pois que, o clone 702, no qual a invasão foi menor, regista uma cotação de 4,73. Pelo contrário, o clone onde a invasão fúngica registou uma maior cotação foi o clone 484 (cotação do crescimento fúngico de 5,00 a partir do sexto dia). A partir deste momento, o clone 484, passa a ser designado por clone susceptível e o clone 702, apesar de não ser verdadeiramente resistente, passa a ser designado por clone resistente.

Na Fig. 4-4 é possível atestar o aspecto de tecido caloso resistente ao longo de sete dias de incubação com 10 µL de uma suspensão de zoósporos de *P. cinnamomi*.

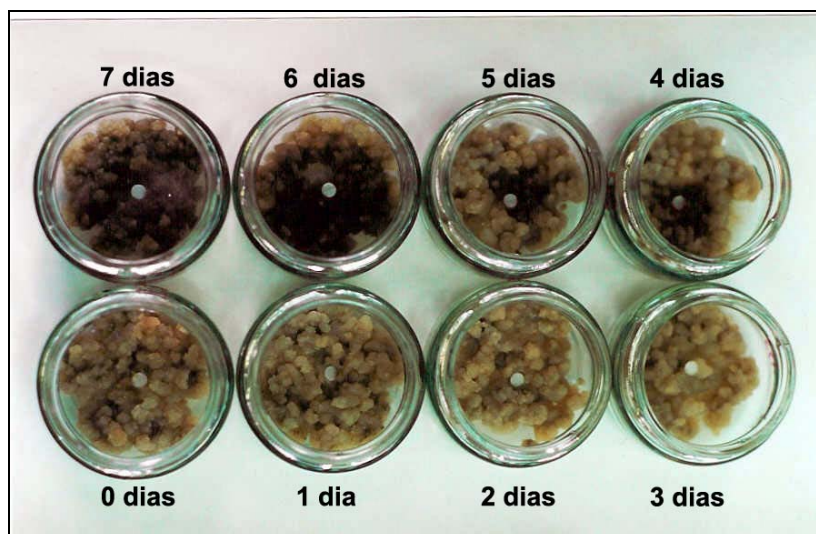


Fig. 4-4: Aspecto de tecido caloso resistente ao longo de sete dias de incubação com 10 µL de uma suspensão de zoósporos de *P. cinnamomi*.

Da análise da figura anterior é possível comprovar que no tecido resistente o crescimento micelial é mais limitado, as hifas são mais esparsas e dificilmente atingiam o limite do clone ao fim dos sete dias de incubação. A partir do quarto dia, observa-se um escurecimento do tecido, que começava na região de origem da inoculação e que ia aumentando diametralmente até ao sétimo dia.

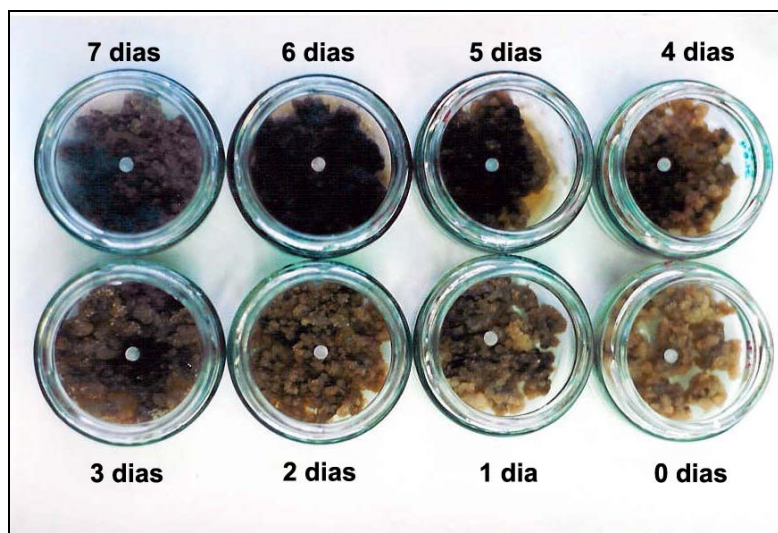


Fig. 4-5: Aspecto de tecido caloso susceptível ao longo de sete dias de incubação com 10 µL de uma suspensão de zoósporos de *P. cinnamomi*.

Na Fig. 4-5 é possível verificar o aspecto de tecido caloso susceptível ao longo de sete dias de incubação com 10 µL de uma suspensão de zoósporos de *P. cinnamomi*. É possível sublinhar que no tecido susceptível a colonização era mais extensa, as hifas, sobretudo nos dias seis e sete, envolviam o tecido caloso numa manta micelial e atingiam o limite do clone ao fim de

seis dias de incubação. A partir do primeiro ou segundo dia, observa-se um escurecimento do tecido, que começava na região de origem da inoculação e que ia rapidamente aumentando em diâmetro.

4.3.3. Taxas de Crescimento do Tecido Caloso Sob Diferentes Regimes de Fitorreguladores

Os clones (resistente e susceptível) foram testados contra nove meios de cultura, no sentido de compreender o incremento do peso fresco do tecido em função da composição em reguladores de crescimento (Tabela 4-2). Este ensaio teve por objectivo verificar se a composição em reguladores de crescimento, podia ou não induzir resistência/susceptibilidade nos clones ensaiados.

Tabela 4-2: Composição auxina/citocinina para análise da contribuição dos reguladores de crescimento nos mecanismos de resistência.

NAA(mgL ⁻¹) BAP (mgL ⁻¹)	1,000 (5,37 µM)	1,500 (8,06 µM)	2,000 (10,74 µM)
0,100 (0,44 µM)	MTC-1	MTC-2	MTC-3
0,500 (2,22 µM)	MTC-4	MTC-5	MTC-6
1,000 (4,44 µM)	MTC-7	MTC-8	MTC-9

Na Fig. 4-6 exhibe-se o aspecto de tecido caloso controlo resistente (A) e susceptível (B), ao fim de 4 semanas de crescimento em MTC.

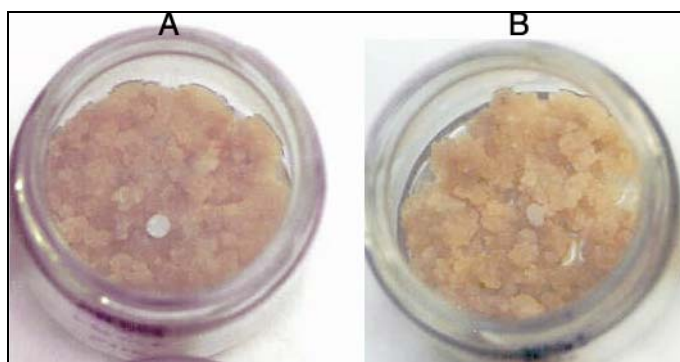


Fig. 4-6: Aspecto de tecido caloso controlo resistente (A) e susceptível (B).

Como é fácil reconhecer, o tecido caloso resistente (A) não aparentava diferenças, ocupando a totalidade da superfície do meio de cultura, e ostentava um aspecto, no que respeita à

cor e consistência, em tudo semelhante ao do tecido caloso susceptível (B). Contudo, tendo por base, a quantificação do crescimento do tecido caloso (*IPFTC*) verificamos algumas diferenças assinaláveis (Gráfico 4-2).

Assim, apesar da similitude aparente dos tecidos registou-se um incremento de peso fresco diferenciado entre estes dois tipos de tecidos.

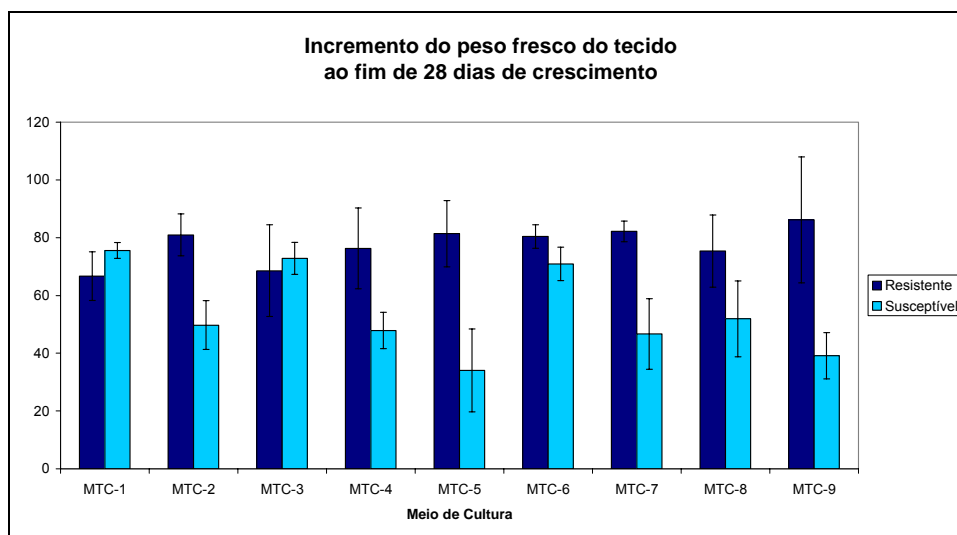


Gráfico 4-2: Representação do incremento do peso fresco (%) do tecido resistente e susceptível ao fim de 28 dias de crescimento.

No gráfico anterior apresentam-se as diferenças entre os incrementos dos pesos frescos dos tecidos (resistente e susceptível), nos nove meios testados (MTC-1 a MTC-9). São evidentes as diferenças nos incrementos dos dois tecidos. A média do incremento do peso fresco do tecido resistente é de 77,56 ($\pm 6,480$), obtendo um valor máximo de 86,17 para o meio MTC-9 e um valor mínimo de 66,68 para o meio MTC-1. A média do incremento do peso fresco do tecido susceptível é de 54,32 ($\pm 15,153$), obtendo um valor máximo de 75,58 para o meio MTC-1 e um valor mínimo de 34,10 para o meio MTC-5.

Na Tabela 4-3 apresenta-se as provas de ANOVA em ordens de Kruskal-Wallis para o incremento do peso fresco (%) do tecido resistente e susceptível ao fim de 28 dias de crescimento.

Tabela 4-3: Teste de Kruskal-Wallis para o incremento do peso fresco (%) do tecido resistente e susceptível ao fim de 28 dias de crescimento em função do tipo de meio e do tipo de clone.

Teste de Kruskal-Wallis	Incremento do pesos fresco do tecido em função de:	
	Tipo de clone	Meio de cultura
<i>Qui-quadrado</i>	107,563	15,816
<i>GL</i>	1	8
<i>Sig. assintótica</i>	0,000***	0,045*

A tabela anterior prova que as diferenças encontradas para o incremento do peso fresco do tecido resistente e susceptível, ao fim de 28 dias de crescimento, são estatisticamente muito significativas ($p < 0,001$) em função do tipo de clone e estatisticamente pouco significativas em função do meio de cultura ($p < 0,05$).

4.3.3. Avaliação Ultrastrutural de Tecido Caloso Resistente e Susceptível Infectado

A natureza complexa da superfície do tecido caloso torna difícil determinar exactamente quão longe ocorreu avanço do fungo.

Na Fig. 4-7 apresenta-se o aspecto geral das células do tecido caloso não infectado.

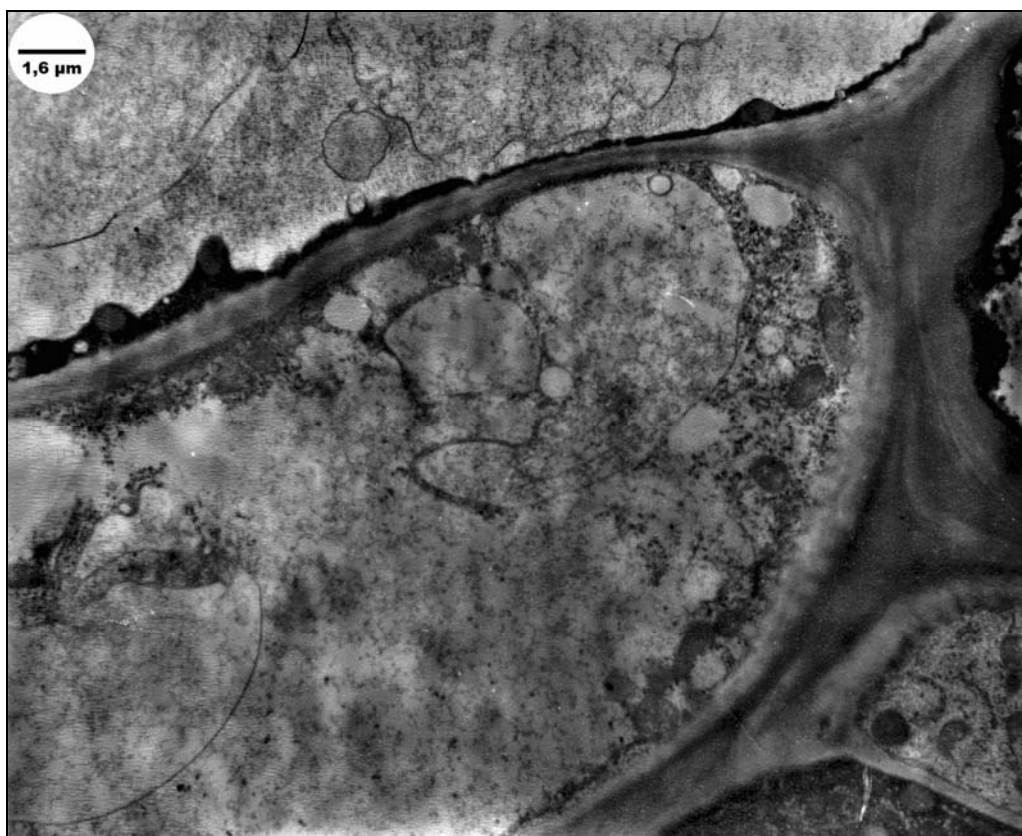


Fig. 4-7: Aspecto geral de células de tecido caloso não infectadas.
B – 6400 x.

Da análise da micrografia apresentada na figura anterior é possível denotar o aspecto intacto das células do tecido caloso. As células apresentam-se túrgidas, preenchidas por um vacúolo de grandes dimensões localizado centralmente.

Na Fig. 4-8 apresenta-se o aspecto geral de células de tecido caloso da zona 1 em interação com células de *P. cinnamomi*.

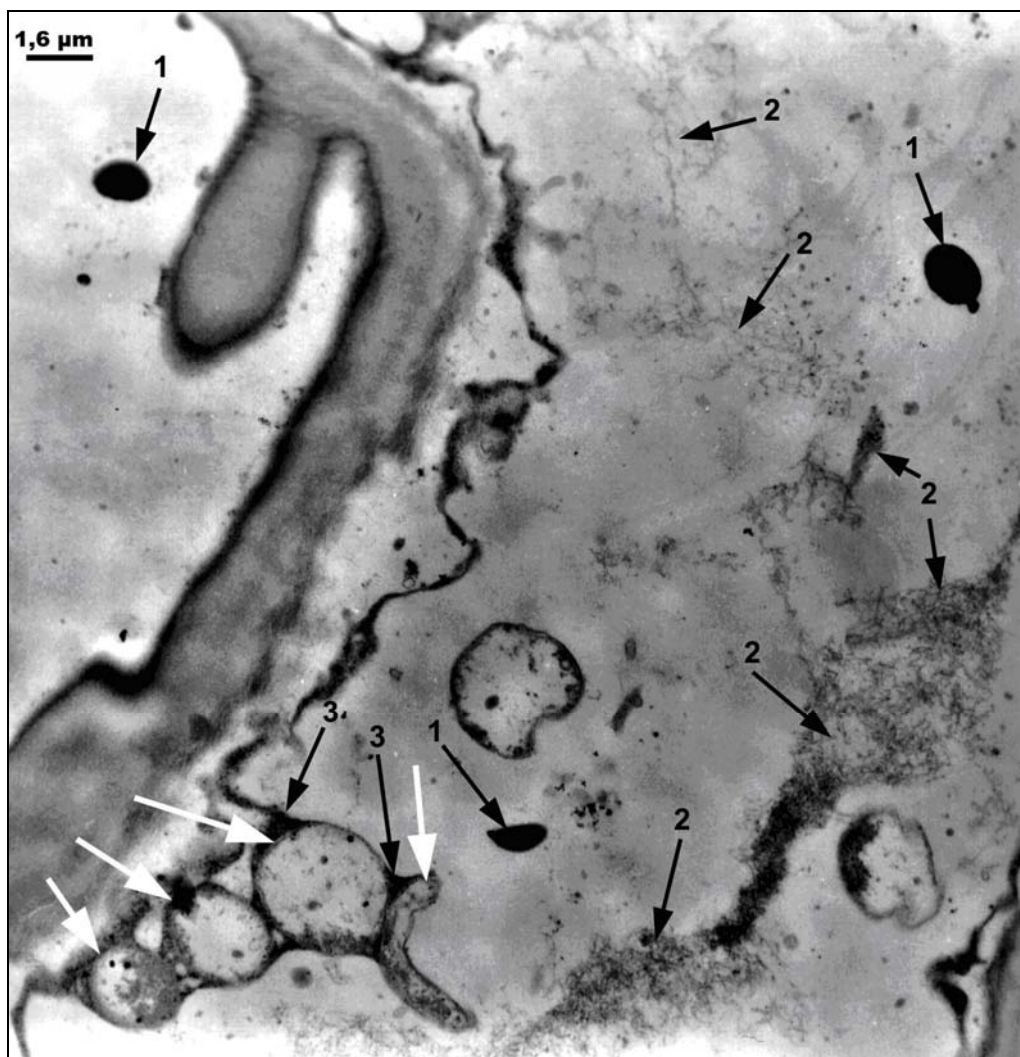


Fig. 4-8: Aspecto geral de células de tecido caloso em interação com células de *P. cinnamomi*.

Zona 1: Setas negras: 1 – Acumulação intracelular de material electrondenso globoso e lenticulares de grandes dimensões; 2 - colapso do tecido levou à desintegração e desorganização total das membranas do citoplasma na célula; 3 - de material electrondenso granular em torno das hifas de penetração; Setas brancas – hifas de penetração. (6400 X)

Da análise da micrografia anterior é possível registrar o aspecto geral das células do tecido caloso infectadas da zona 1. Quanto ao aspecto geral pode verificar-se um maior nível de desorganização, sobretudo, afecto às membranas citoplasmáticas que se encontram agrupadas em novelos desarranjados no espaço intracelular. A célula perdeu a turgescência que a caracteriza e encontra-se colapsada. Nesta zona da interacção verifica-se já a acumulação de materiais globulares e lenticulares de grandes dimensões no espaço intracelular. Em torno das hifas de penetração também é possível observar a acumulação de material electrondenso

granular. Na zona 1 a maioria das células encontram-se neste estado de perturbação. A percentagem de células intactas é menor que 10%.

Na Fig. 4-9 apresenta-se o aspecto geral de células de tecido caloso da zona 2 em interacção com células de *P. cinnamomi*.

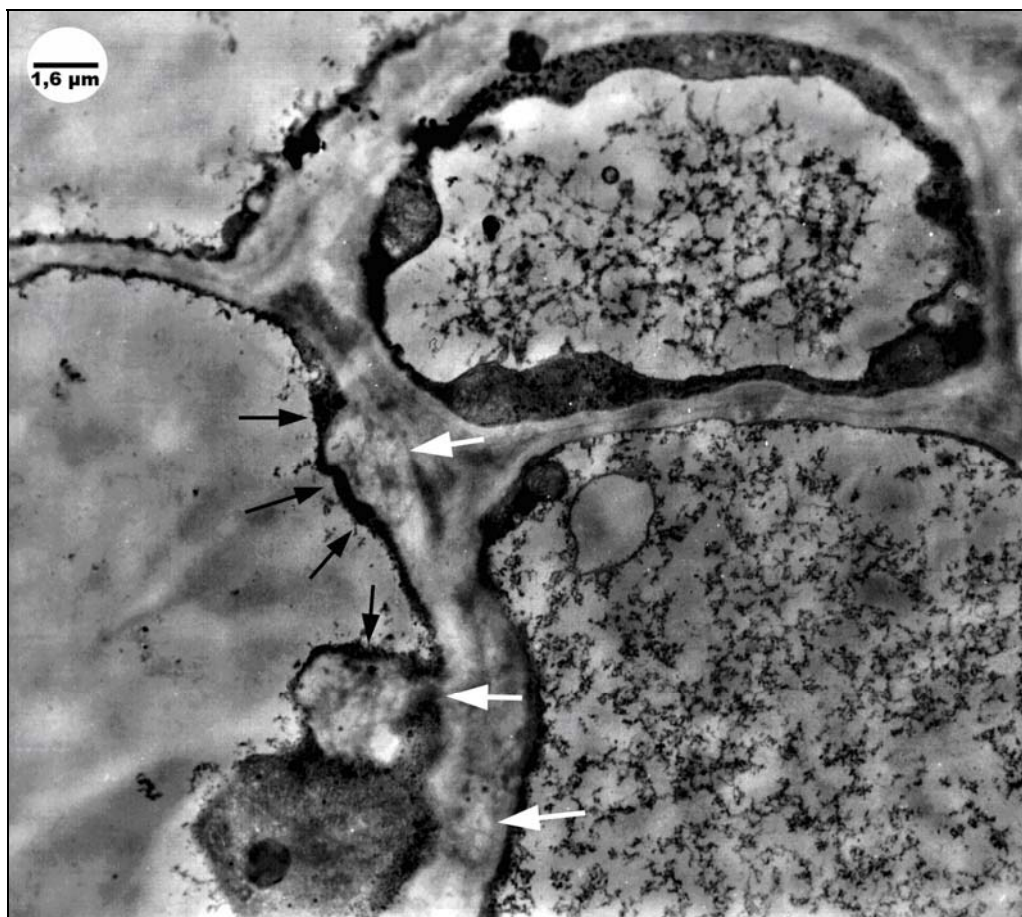


Fig. 4-9: Aspecto geral de células de tecido caloso em interacção com células de *P. cinnamomi*.

Zona 2: Setas negras – acumulação de material electrodensso granular em torno das hifas de penetração; Setas brancas – hifas de penetração. (6400 X)

Da análise da figura anterior é possível verificar a presença de hifas de penetração nos espaços intercelular. Na interacção, as células do tecido caloso acumulam material electrodensso do tipo granuloso em torno das células fúngicas, provavelmente, numa tentativa de criar uma barreira física que impeça a penetração do agente etiológico. O crescimento das hifas estava sobretudo limitado aos espaços intercelulares. É possível ainda sublinhar que apenas a célula que está a ser infectada se encontra em desorganização, enquanto que algumas células vizinhas aparentam alguma imperturbação. A acumulação de material electrodensso do tipo globoso ou lenticular não foi registada nesta zona da interacção. Notar que quanto mais afastado do local de origem da infecção (Zona 2) menor é o grau de perturbação.

Regista-se para todas as zonas de amostragem perda de turgescência das células e o colapso das células do tecidos caloso. Ocorrência de materiais contrastantes na microscopia electrónica de transmissão do tipo granulares, vesiculares e globulares (electrondensos), acumulados sobretudo nos vacúolos do hospedeiro indicam necrose. Nas células da zona 2 podem ser observados estados iniciais de necrose.

4.4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Após infecção dos tecidos calosos com 10 µL suspensões de zoósporos de *P. cinnamomi* foram obtidas diferentes cotações do crescimento fúngico para os diferentes clones de *Quercus suber* disponíveis. Nenhum clone disponível apresentava uma cotação de crescimento de 0 ao longo do tempo da experiência, isto é, a existência de clones verdadeiramente resistentes não foi observada. A cotação do crescimento micelial sobre os tecidos calosos foi obtida por aplicação do método descrito por HELGESON *et al.* (1972) e como resultado foram obtidas diferentes gradações designadamente: clones que ficavam totalmente envoltos por um tapete micelial; clones que apresentavam um escurecimento parcial e pouco micélio aéreo; clones com escurecimento completo e pouco micélio aéreo. As diferenças encontradas devem-se sobretudo à morfologia e textura dos tecidos, assim os tecidos menos densos, mais humedecidos eram os mais intensamente colonizados (tecido caloso completamente envolto por uma manta micelial) e aqueles menos colonizados possuíam uma aparência firme e seca (clones que apresentavam um escurecimento total ou parcial e algum ou pouco micélio aéreo). De acordo com McCOMB *et al.* (1987) quando se avalia o crescimento fúngico sobre o tecido caloso, é importante utilizar tecido caloso com textura comparável. Para o desenho experimental subsequente recorreu-se aos tecidos que apresentavam estas características, isto é, a triagem teve como critérios de inclusão o facto dos tecidos crescerem rapidamente e homoganeamente (ao fim de 4 semanas de crescimento a totalidade da superfície de agar teria de estar homoganeamente recoberta), serem do tipo firmes e secos (consistência friável, densa e não demasiadamente compacta nem húmidos). Estes critérios excluíram a totalidade dos clones de Trás-os-Montes e dos de natureza adulta (cujas consistências dos tecidos calosos era compacta e o crescimento lento e não homogéneo). Os clones da região de Aveiro eram medianamente susceptíveis. Entre os clones disponíveis foram eleitos dois clones de natureza jovem com origens distintas: o clone 702 de Montemor-o-Novo e o clone 484 de Ponte-de-Sôr.

O tecido caloso do clone 702 aparentemente não era dissemelhante do tecido caloso do clone 484. Contudo, tendo por base, a análise do incremento do peso fresco do tecido caloso foi possível constatar que o primeiro possuía um incremento médio de 77,56 ($\pm 6,480$) e o segundo de 54,32 ($\pm 15,153$). As ANOVAs em ordens de Kruskal-Wallis (testes não-paramétricos) para o

incremento do peso fresco (%) revelaram que estas diferenças eram estatisticamente muito significativas ($p < 0,001$) em função do tipo de clone e estatisticamente pouco significativas em função do meio de cultura ($p < 0,05$). Em 1987, McCOMB *et al.*, estudaram vários sistemas que incluíam o agente patogénico *Phytophthora cinnamomi* e tecido caloso de várias espécies. Nesse estudo a concentração em reguladores de crescimento no meio de cultura induziu uma alteração da morfologia do tecido caloso assim como o grau de crescimento do fungo (McCOMB *et al.*, 1987). No corrente estudo, a concentração em reguladores de crescimento no meio de cultura não contribuía, exactamente, com alterações na morfologia (os tecidos mantinham as suas características de crescimento rápido, ao fim de 4 semanas de crescimento a totalidade da superfície de agar estava homogeneamente recoberta, possuíam uma consistência friável, densa e não demasiadamente compacta e apresentavam-se com uma aparência seca), mas sim, com uma alteração volume de tecido produzido (o clone 702 era mais produtivo que o clone 484).

Para os dois clones seleccionados e após infecção com 10 μ L da suspensão de zoósporos *P. cinnamomi* (estirpe H1000) foram obtidas cotações do crescimento fúngico sobre o tecido caloso diferenciadas no decorrer dos sete dias de incubação. Assim, o clone 484 apresentava sintomas de infecção muito mais precocemente do que o clone 702: a cotação do crescimento fúngico sobre o tecido caloso do primeiro clone, ao fim dos sete dias, era máxima o que não acontecia com o segundo; ao longo do tempo a cotação do crescimento fúngico para o clone 702 era cerca de metade da do clone 484, com a excepção dos dois últimos dias. Atendendo a que a cotação do crescimento fúngico era maior para o clone 484 do que para o clone 702, o primeiro clone passou a ser designado por clone susceptível e o segundo por clone resistente (apesar de não ser verdadeiramente resistente). Descrevendo os acontecimentos que ocorriam durante os sete dias de incubação registava-se que no tecido resistente havia uma limitação do crescimento micelial, um escurecimento parcial progressivo, a quantidade de micélio visível era menor e nunca atingia o limite do clone. Enquanto que no clone susceptível os sintomas de infecção eram agravados: o micélio era mais denso e atingia o limite do clone, mais precocemente era observável o escurecimento progressivo do tecido. Estes resultados são concordantes com os de McCOMB *et al.* (1987), onde ocorria uma resposta hipersensível caracterizada pela alteração de cor para vermelho-acastanhado na vizinhança imediata da localização das hifas e nos tecidos resistentes e a resistência era detectada por crescimento limitado e esparso sobre o tecido caloso, em contraste com o crescimento prolífico e aéreo registado no meio de cultura ou sobre o tecido caloso susceptível.

Da análise dos aspectos ultrastruturais da interacção entre os dois clones e *P. cinnamomi* foi difícil verificar quão diferentes eram as duas respostas. As diferenças reflectiram-se mais ao nível do número de células que denotavam perturbações quando na presença do agente infeccioso. No caso do clone 484 o nível de perturbação era ligeiramente maior do que o do clone 702. Contudo a natureza intrincada da superfície do tecido caloso impossibilita determinar com exactidão quão intensamente ocorreu essa interferência. Por outro lado, foi relativamente fácil

determinar a evolução da perturbação desde a origem até ao limite do tecido caloso (resistente e susceptível), isto é, quanto mais próximo se estava da origem da inoculação tanto maior era o grau de desorganização celular. Enquanto que as células do tecido caloso não infectadas denotavam um aspecto intacto, estavam túrgidas e preenchidas por um vacúolo de grandes dimensões localizado centralmente, as células infectadas apresentavam-se colapsadas e desorganizadas internamente. Foi possível identificar a presença de hifas de penetração nos espaços intercelular sobretudo na zona 1. Na interacção, as células do tecido caloso acumulam material electrodensso do tipo granuloso à volta da superfície de contacto com as células fúngicas. Este material, provavelmente, impede, pelo menos temporariamente, a penetração do agente infeccioso pela formação de uma barreira física. Foi possível verificar que o crescimento das hifas estava sobretudo limitado aos espaços intercelulares. Nas zonas mais afastadas da origem (zona 2) apenas as células que estavam em contacto íntimo com as células fúngicas apresentavam algum nível de desorganização, enquanto que nas zonas mais próximas da origem da infecção (zona 1), praticamente, todas as células apresentavam elevados níveis de desorganização. Na zona 1 era possível verificar um nível elevado de desorganização das membranas citoplasmáticas. Nesta zona era possível observar que as membranas celulares que se encontram agrupadas em novelos desarranjados no espaço intracelular. Estas células perdiam a turgescência e encontravam-se colapsadas. Na zona 1 da interacção verificou-se a acumulação de materiais globulares e lenticulares de grandes dimensões no espaço intracelular. Em torno das hifas de penetração também é possível observar a acumulação de material electrodensso granular. Pode concluir-se que para todas as zonas de amostragem ocorre perda de turgescência das células e colapso das células do tecido caloso. A acumulação de materiais contrastantes na microscopia electrónica de transmissão do tipo granulares, lenticulares e globulares (electrodensos), sobretudo no espaço intracelular (por vezes ao nível do vacúolo) do hospedeiro indicam necrose. Nas células da zona 2 podem ser observados estados iniciais de necrose. Os dados aqui apresentados estão parcialmente de acordo com os de JANG e TAINTER (1990), isto é, não foi possível registar uma diferença tão marcada entre o tecido resistente e o susceptível. Segundo estes autores, pelo facto de não terem encontrado reacções de incompatibilidade anatómicas (formação de barreiras efectivas na delimitação do crescimento fúngico) parecia que os mecanismos de regulação da resistência eram do tipo fisiológicos e bioquímicos pareciam no sistema *Pinus* - *P. cinnamomi*. Para o sistema *Q. suber* – *P. cinnamomi* também parece evidente a prevalência dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos sobre os físicos.

5. CONDICIONAMENTO HORMONAL DA RESISTÊNCIA EM CULTURAS DE TECIDOS CALOSO

5.1. INTRODUÇÃO

Neste capítulo pretende-se estabelecer relação entre o condicionamento hormonal da resistência e os parâmetros analisados (ânions, cátions e péptidos) em dois clones diferentes (resistente e susceptível).

A maioria dos agentes patogénicos das plantas podem entrar nos tecidos das plantas susceptíveis directamente através das células epidérmicas, através das paredes anticlinais das células epidérmicas, através dos estomas ou de outras aberturas naturais ou através de ferimentos (HEATH e STUMPF, 1986). Normalmente a infecção tem origem num esporo situado junto da superfície da planta que germina num tubo, que se diferencia em apressório que permite a entrada do fungo na planta (HEATH e STUMPF, 1986). A maioria dos agentes patogénicos mostram preferência no modo de penetração, e para os fungos que não entram através de ferimentos, normalmente os estudos citológicos sugerem que o fungo adere ligeiramente à superfície da planta antes da sua entrada independentemente de se formar um apressório (HEATH e STUMPF, 1986).

Métodos citoquímicos e bioquímicos estão a ser empregues na compreensão do mecanismo de adesão (HOHL, 1991).

Neste estudo a forma de entrada do agente patogénico no tecido vegetal foi artificialmente forçada. Assim, utilizou-se tecido caloso, indiferenciado que, por não estar organizado em camadas especializadas, não constitui uma verdadeira barreira à penetração fúngica e responde à infecção de forma mais homogénea.

Na década de 80 foi dada ênfase à importância dos glicanos, citosano, proteínas, glicoproteínas e ácidos gordos insaturados de fungos e fragmentos de parede fúngica, serem indutores de sinal para a síntese e a acumulação de fito-alexinas (de WIT, 1986). No género *Phytophthora* podem ser produzidos pelo menos três tipos de agentes indutores de sinal, designadamente: glicanos, glicoproteínas e ácidos gordos insaturados (de WIT, 1986).

A grande parte das plantas são capazes de resistirem à infecção pela maioria dos agentes patogénicos, por um lado, por possuírem um amplo arranjo de componentes defensivos integrados e/ou, por outro lado, porque a entrada de determinados agentes patogénicos poder ser fisicamente bloqueada. Pelo menos alguns agentes patogénicos conseguem multiplicar-se no interior da planta e produzir metabolitos particulares. Noutros casos, as plantas confrontadas com agentes patogénicos potenciais iniciam uma resposta de defesa que muitas vezes inclui uma reacção hipersensível (morte celular localizada à volta do local de entrada do agente patogénico) assim como a indução de compostos, tais como fito-alexinas, que podem desenvolver um papel defensivo (CHASAN, 1994).

5.1.1. Resposta das Plantas Face aos Agentes Patogénicos

A pesquisa das interacções planta-agente patogénico é distinguível dos outros campos da bioquímica vegetal, uma vez que estão envolvidos dois genomas, o do hospedeiro e o do agente patogénico (WALTON, 1997). Nesta interacção está patente um processo designado por co-evolução (pressão de selecção recíproca, ao longo do tempo da evolução, dos genomas do hospedeiro e do agente patogénico) onde se reflecte um alto grau de complexidade (WALTON, 1997). Quando uma planta e um agente patogénico entram em contacto começa a ocorrer comunicação íntima entre os dois organismos que se reflecte numa troca química e bioquímica muito interessante de detectar (WALTON, 1997).

Numa relação hospedeiro-agente patogénico, a actividade do agente patogénico centra-se na colonização do hospedeiro e na utilização dos seus recursos, enquanto que as plantas estão adaptadas por forma a detectarem a presença dos agentes patogénicos e a responderem com defesas antimicrobianas e outras respostas ao stress (WAN *et al.*, 2002).

De uma forma geral, as plantas, quando não são tratadas, podem ficar sujeitas à invasão devastadora pelos agentes patogénicos comuns ou sobreviver às infecções sem danos, em virtude das suas próprias defesas naturais (GOZZO, 2004).

As espécies, vegetal e agente patogénico, no decurso da evolução, desenvolveram-se em simultâneo, o que quer dizer que uma barreira *standard* da espécie vegetal à infecção microbiana pode ser ultrapassada por uma determinada espécie de agente patogénico, mas que, também, por outro lado, os agentes patogénicos bem sucedidos podem ser bloqueados por uma única resposta adaptativa de determinadas plantas (WAN *et al.*, 2002). À medida que se desenrola uma infecção, o metabolismo da planta representa muitas vezes uma mistura irregular de respostas de resistência e de respostas de susceptibilidade (WAN *et al.*, 2002).

Na luta defensiva da planta contra a invasão por um agente patogénico pode surgir a resposta hipersensível (RH). Esta defesa surge quando se verifica uma interacção incompatível entre hospedeiro e agente patogénico, isto é, quando uma planta, que transporta um gene de resistência, é infectada com uma estirpe de uma espécie normalmente patogénica que transporta um gene de avirulência (GOZZO, 2004). Neste caso desenrola-se o reconhecimento de gene-por-gene nos tecidos que foram desafiados, os quais são prontamente induzidos a dispararem um conjunto de reacções bioquímicas que tendem a parar o agente patogénico à volta do local da tentativa de invasão (Flor, 1971 citado por GOZZO, 2004). Este processo de resistência é iniciado por uma explosão oxidativa que culmina numa lesão necrótica localizada. Subsequentemente, difunde-se gradualmente pela planta, uma protecção sistémica contra outras infecções, conhecida por resistência sistémica adquirida (SAR), através da qual a planta adquire uma imunização inespecífica de longa duração contra agentes patogénicos virulentos, mesmo não relacionados, incluindo vírus, bactérias e fungos (LAMB e DIXON, 1997).

A noção de que uma espécie de sistema imunitário pudesse operar nas plantas remonta ao início do século XX e foi proposto pela primeira vez por Ross para explicar a resistência sistémica à infecção vírica nas plantas preliminarmente inoculadas com o vírus do mosaico da planta do tabaco (GOZZO, 2004). Após a observação da acumulação de fito-alexinas na vizinhança próxima do local de infecção tornou-se evidente que estas moléculas apenas um dos muitos eventos moleculares responsáveis pelo sucesso no impedimento da invasão do agente patogénico (GOZZO, 2004). As interacções entre as plantas e os agentes patogénicos induzem uma série de respostas de defesa (HAMMOND-KOSACK e JONES, 1996). Podem ser observados fluxos de cálcio e de outros iões e as proteínas quinases são activadas. A produção de compostos tais como intermediários de oxigénio reactivo (ROIs), Ácido salicílico (SA), óxido nítrico (NO), etileno (ETH) e ácido jasmónico (JA) podem causar a activação de muitas respostas em cadeia (WAN *et al.*, 2002). A síntese de peptídeos antimicrobianos, compostos fenólicos, flavonóides e outros compostos do tipo fito-alexina é induzida, e são activadas as respostas de reforço da parede celular (WAN *et al.*, 2002). As vias de sinalização defensiva que conduzem à activação das respostas antimicrobianas resultam na acção concertada de um determinado número de

moléculas adicionais relacionadas com a sinalização, incluindo iões, canais de iões, ROIS, NO, SA, JA, ETH, MAPK/quinases, factores de transcrição, lipases, proteases, etc. (WAN *et al.*, 2002).

As interacções hospedeiro-agente patogénico (*Phytophthora*) relacionadas com as superfícies de contacto entre os dois organismos foram resumidas por HOHL (1991). Este autor referiu, que a adesão é o tipo mais visível de interacção de superfícies e no caso de *Phytophthora* este material é constituído por proteínas e/ou glicoproteínas e, por vezes, por polissacáridos produzidos pelo fungo. Aparentemente as espécies do género *Phytophthora* produzem pelo menos três tipos de indutores de sinal: polissacarídeos; glicopéptidos, lípidos e péptidos indutores de necrose (RICCI *et al.*, 1986). Com efeito, são diferentes os tipos de moléculas que estão envolvidos na adesão agente patogénico, por exemplo, à membrana plasmática, à parede celular do hospedeiro ou a uma placa de petri (HOHL, 1991). O contacto físico faz disparar reacções tanto no agente patogénico (produção de material adesivo) como na célula hospedeira (produção de calose ou outro polissacarídeo relacionado) (HOHL, 1991).

5.1.1.1. Fluxos de iões/canais/bombas/ Ca^{2+}

As alterações momentâneas na permeabilidade iónica da membrana plasmática parecem ser um acontecimento precoce comum na sinalização defensiva (WAN *et al.*, 2002). Para além do reconhecimento do agente patogénico, os canais iónicos localizados na membrana plasmática parecem aumentar os fluxos iónicos na membrana plasmática e activarem respostas defensivas em cadeia (WAN *et al.*, 2002).

PARKER *et al.* (1991) estudaram os aspectos moleculares das interacções hospedeiro-parasita em *Phytophthora* e conjecturaram sobre a possibilidade de as plantas possuírem diferentes locais de ligação nas membranas plasmáticas para componentes de superfícies estruturalmente distintos para os agentes patogénicos fúngicos. Estes locais de reconhecimento dos agentes patogénicos convergiam o sinal por meio de uma cadeia de tradução, que por sua vez faz disparar múltiplas reacções de defesa. Estes autores previram ainda o envolvimento da entrada de Ca^{2+} e de H^+ , da saída de K^+ e da fosforilação de proteínas dependentes da ligação ao Ca^{2+} (PARKER *et al.*, 1991).

Os canais de K^+ e Ca^{2+} de resposta a indutores de sinal na membrana plasmática foram demonstrados a serem regulados por tratamentos relacionados com a defesa (WAN *et al.*, 2002). Entre outros iões, o Ca^{2+} desempenha um papel importante no estabelecimento da defesa da planta, provavelmente a partir de proteínas ligadas ao Ca^{2+} e proteínas sensores tais como a calmodulina (CaM) e proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs) (WAN *et al.*, 2002).

5.1.1.2. Explosão oxidativa

Normalmente, no espaço de poucos minutos após o contacto entre uma planta hospedeiro e um agente patogénico, ROIs tais como $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 são produzidos numa explosão oxidativa (LAMB e DIXON, 1997). A activação da explosão oxidativa é um componente central de um sistema de sinais altamente amplificado e integrado, que também envolve o ácido salicílico e perturbações do Ca^{2+} citosólico, os quais disparam a expressão de mecanismos de resistência à doença (LAMB e DIXON, 1997). Após a explosão oxidativa e para evitar o auto-prejuízo, o metabolismo da planta aumenta a síntese de antioxidantes estratégicos, tais como o ácido ascórbico, e a glutatona, e enzimas relacionadas para substituírem o potencial oxidante do H_2O_2 suavizando os oxidantes progressivamente (GOZZO, 2004). Na resistência gene-por-gene das plantas, a explosão oxidativa é seguida por uma rápida morte celular à volta do tecido onde foi tentada a invasão, produzindo a lesão necrótica típica da resposta hipersensível (GOZZO, 2004). A resposta hipersensível, como uma consequência da interacção entre os produtos dos genes, é geralmente considerada uma forma programada de morte celular, embora difira da morte celular programada fisiológica em alguns aspectos que são remanescentes da necrose induzida por compostos tóxicos ou ferimentos físicos (GOZZO, 2004).

5.1.1.3. Óxido nítrico

Como acontece nas ROIs, o óxido nítrico (NO) aparentemente desempenha um papel importante na indução da defesa da planta (WAN *et al.*, 2002). Estudos recentes demonstraram que a produção de NO é aumentada no estabelecimento da HR, mas que este aumento de produção por si só não é suficiente para activar a HR (WAN *et al.*, 2002). A HR aparentemente é despoletada pelo balanço da produção de ROIs e NO e pode ser activada pela interacção do NO com o N_2O_2 gerado a partir $O_2^{\cdot-}$ pela dismutase do superóxido (WAN *et al.*, 2002). O NO pode activar a sinalização defensiva em cadeia pela produção de GMPc, o qual provavelmente activa os canais mediados por nucleótidos cíclicos conduzindo a influxos de Ca^{2+} e K^+ e activação em cadeia de genes (WAN *et al.*, 2002).

5.1.1.4. Ácido salicílico

O ácido salicílico, produto natural resultante da via fenilpropanóide, desempenha um papel chave na resistência a doenças. Paradoxalmente, o ácido salicílico, quando administrado na ausência do agente patogénico, induz um sinal fraco, muitas vezes requerendo concentrações de

0,5 a 5 mM para induzir resistência adquirida, ou mecanismos relacionados com a defesa, ou condicionar *a priori* sistemas de sinal (SHIRASU *et al.*, 1997). Por outro lado, o ácido salicílico exógeno acumula-se até concentrações superiores a 70 pM nos locais onde o agente patogénico tenta a infecção (SHIRASU *et al.*, 1997). Em 1997, SHIRASU *et al.*, propuseram que o controlo fino e rápido da amplificação de sinal tem uma importante contribuição para a função do ácido salicílico na indução dos mecanismos de resistência as doenças.

O fenómeno da resistência sistémica adquirida parece envolver a mediação pelo ácido salicílico (SA) uma vez que foi observada a síntese de proteínas relacionadas com a patogénese (proteínas PR) após o tratamento exógeno com salicilatos e o aumento da resistência a infecções, enquanto que estes dois efeitos eram abolidos em plantas transgénicas onde a produção de ácido salicílico era impedida (GOZZO, 2004). Com efeito, a prova de que o SA podia actuar como activador exógeno foi relatada em 1979 por observação de que o efeito protector era induzido contra o TMV em tabaco (White, 1979 citado por GOZZO, 2004). Mais tarde, e de forma mais importante, foram descobertos químicos sintéticos que podem ser considerados como análogos funcionais do SA, mas que actuam de forma mais potente que o SA e permitem que as plantas mono- e dicotiledóneas resistam a uma gama mais variada de agentes patogénicos (Kessmann *et al.*, 1994 citado por GOZZO, 2004). Estes forneceram um método para induzir a SAR por um tratamento preventivo com compostos que actuam como activadores (ou sensibilizadores). Após um tempo adequado para a sua aplicação, a planta é alertada para reagir rapidamente com as suas próprias defesas naturais a uma ataque por um agente patogénico. Um agente químico com tais propriedades é o ácido metilester de benzo(1,2,3)-tiadiazole-7-carbotiólico, muitas vezes abreviado por BTH e comercializado pela marca Bion (Kessmann *et al.*, 1996 citado por GOZZO, 2004).

5.1.1.5. Ácido jasmónico e jasmonato

O ácido jasmónico é um regulador de crescimento vegetal que ocorre naturalmente nas plantas superiores. Desde a sua descoberta, nos óleos essenciais de *Jasminum*, por Demole *et al.* (1962 citado por SCHWEIZER *et al.*, 1997), têm sido descritos vários papéis para este composto (ou o composto com ele relacionado, o metil jasmonato) tanto durante o desenvolvimento vegetal e como uma resposta aos *stresses* bióticos e abióticos (CREELMAN e MULLET, 1995). CREELMAN e MULLET (1995) sintetizaram os papéis desempenhados pelo ácido jasmónico e o seu derivado, metil jasmonato. Na Fig. 5-1 apresenta-se um diagrama mostrando a síntese de ácido jasmónico a partir do ácido linoleico em resposta aos sinais de desenvolvimento e ambientais.

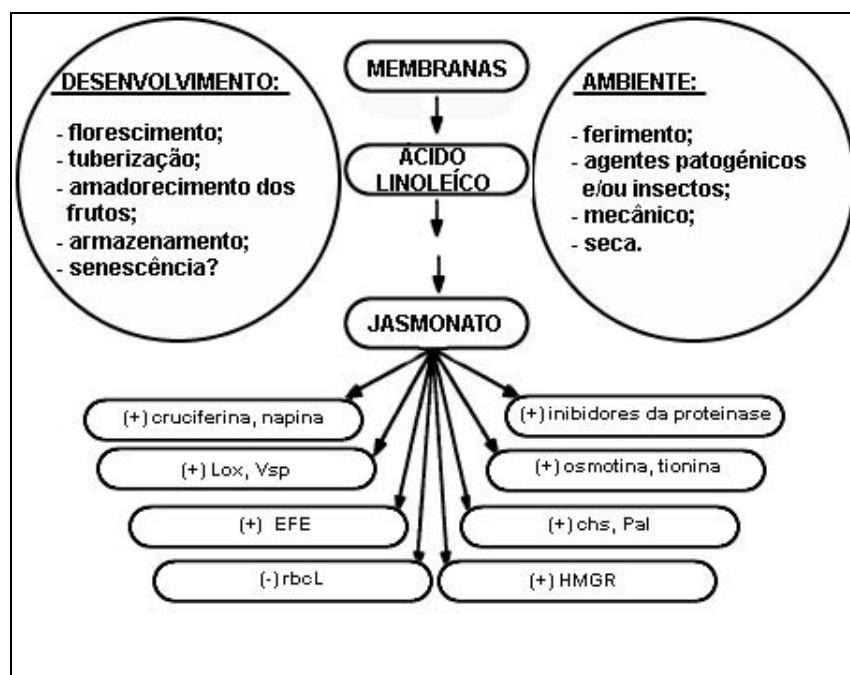


Fig. 5-1: Síntese de ácido jasmônico a partir do ácido linoleico em resposta aos sinais de desenvolvimento e ambientais.

Estão listados os genes que são induzidos pelo jasmonato (Vsp, fosfatase ácida das proteínas de armazenamento vegetativo; Lox, lipoxigenase, EFE, enzima envolvida na formação de etileno; rbcL, subunidade maior da carboxilase da ribulose bifosfato; pinII, proteinase; inibidor II; tionina, proteína antifúngica; osmotina, proteína antifúngica; chs, sintase da chalcona; liase da amônia-fenilalanina; HMGR, redutase da hidroximetilglutaril CoA. [Adaptado de CREELMAN e MULLET (1995)].

Os compostos de jasmonato derivam do ácido linoleico num processo dependente da lipoxigenase (CREELMAN e MULLET, 1995). Embora seja conhecida a via biossintética do ácido jasmônico existe pouca informação no que respeita à forma como a biossíntese de ácido jasmônico é regulada durante o desenvolvimento das espécies vegetais ou na resposta as *stresses* bióticos e abióticos (CREELMAN e MULLET, 1995). O ácido jasmônico pode influenciar vários aspectos ao longo ciclo de vida das plantas, designadamente: o desenvolvimento geral, a seca, os fermentos mecânicos e eventualmente a fotoxidação (Fig. 5-2).

Em 1997, SCHWEIZER *et al.*, estudaram a possibilidade do papel da via de sinalização octadecanóide com o ácido jasmônico como um componente central na regulação dos genes relacionados com a defesa a doenças relacionadas com a planta do arroz (*Oryza sativa*). Estes investigadores aplicaram ácido jasmônico exogeneamente o que induziu a acumulação de vários produtos dos genes relacionados com a patogénese, como sejam, RNAm e proteínas. Paralelamente, infectaram plântulas germinadas com o agente patogénico. Neste estudo os dados sugeriram que o jasmonato não é necessário para a indução dos genes relacionados com a patogénese e que o ácido jasmônico não coordena respostas de defesa localizadas em plântulas de arroz infectadas. Em vez disso, parecia que o ácido jasmônico estava envolvido numa teia de sinalização juntamente com outras vias induzidas por agentes patogénicos e que podia ser

necessário a um determinado nível mínimo para a indução de alguns genes relacionados com a patogênese (SCHWEIZER *et al.*, 1997).

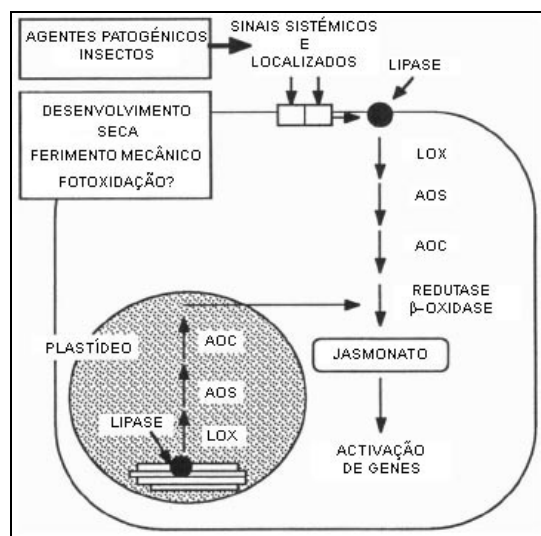


Fig. 5-2: O diagrama mostra duas vias possíveis para a síntese do ácido jasmônico. Os agentes patogênicos e os insectos são representados a produzirem indutores de sinal localizados e sistêmicos que interagem com os receptores da membrana plasmática. A estimulação do receptor faz disparar a libertação mediada pela lipase de ácido linoleico seguida pela conversão em ácido jasmônico pela acção concertada da lipoxigenase (LOX), sintetase do óxido de aleno (AOS), ciclase do óxido de aleno (AOC), redutase 12-oxo-PDA e β -oxidação. Creelman e Mullet propuseram, em 1995, uma via similar originada a partir das membranas plastideais. [Adaptado de CREELMAN e MULLET (1995)].

5.1.1.6. Ácido oxálico e oxalato

O ácido oxálico é produzido por uma grande variedade de fungos, incluindo fungos decompositores, micorrizas, e agentes fitopatogênicos (MAGNUSON e LASURE, 2004). As funções do ácido oxálico têm sido extensivamente descritas e foram revistas em 1996 por DUTTON e EVANS.

Segundo BRAISSANT *et al.* (2004) o oxalato de cálcio monohidrato está associado com os tecidos vegetais do caule, casca e raízes, enquanto que o oxalato de cálcio bi-hidrato pode ser encontrado em fungos do solo associados à podridão e à decomposição das madeiras. A biossíntese de oxalato de cálcio é um processo bem difundido nos reinos Vegetal e Fungi (BRAISSANT *et al.*, 2004).

Segundo DUTTON e EVANS (1996), os fungos utilizam o oxalato na degradação da lenhina, na disponibilidade de nutrientes, na patogênese e na competição. Todos estes papéis envolvem secreção de ácido oxálico e acidificação do meio envolvente do organismo. Assim pensa-se que as enzimas fúngicas citosólicas e excretadas tendem a actuar no sentido de reduzirem o excesso dos níveis de ácido oxálico (TANNER e BORNEMANN, 2000).

Em 1977, Hodginton (citado por MUNIR *et al.*, 2001), afirmou que o metabolismo do ácido oxálico, que ocorre numa vasta gama de plantas superiores, culturas de fungos e mesmo na urina humana, possui um produto final que há muito vinha sendo estudado sob o ponto de vista médico (MUNIR *et al.*, 2001). O ácido oxálico possui três naturezas químicas: é uma fonte de prótons e electrões e um forte agente quelante de metais. MUNIR *et al.* (2001), resumiram as principais fontes de interesse no estudo deste composto, dadas as suas qualidades ecológicas, designadamente: a biorremediação de uma grande variedade de poluentes orgânicos com os sistemas de biodegradação da lenhina; a inactivação de agentes preservadores da madeira que contenham cobre por fungos da podridão da madeira; destoxificação do alumínio poluente pelo trigo mourisco resistente a este elemento; danos nas colheitas devidos ao ácido oxálico produzidos por agentes fitopatogénicos; efeito biofertilizador dos fungos ectomicorrízicos; por ser uma fonte de electrões para a fixação de azoto em *Rhizobium* simbiótico nas leguminosas e; por ser produzido e acumulado, na forma de oxalato de cálcio, por alguns fungos decompositores da madeira (MUNIR *et al.*, 2001).

5.1.1.8. A transmissão de sinal

As fases da transmissão compreendem: detecção, amplificação e resposta. Neste mecanismo estão presentes receptores hormonais de diferentes tipos. A transmissão de sinal faz-se por proteínas da membrana. Nestes mecanismos estão igualmente envolvidos mensageiros secundários. Na transmissão de sinal o cálcio apresenta um papel fundamental, bem como as proteínas envolvidas na homeostase do cálcio. Na bibliografia é possível encontrar vários sistemas modelo para o estudo da transmissão de sinal em células vegetais.

Segundo GRAHAM e GRAHAM (1999) a capacidade de uma planta para o reconhecimento de um agente patogénico incompatível (mediada pela resistência de não-hospedeiro e pela resistência específica da raça) conduz inicialmente a uma reacção de defesa quase universal, a morte hipersensível de células programada na zona de contacto imediato com o agente patogénico. Esta resposta hipersensível (RH), por sua vez, é complementada pela expressão de várias outras formas de resistência induzida, incluindo tanto a resistência adquirida local como sistémica (RAL e RAS) (GRAHAM e GRAHAM, 1999). Em algumas espécies foi descrita uma forma adicional de resistência sistémica induzida (RSI) (GRAHAM e GRAHAM, 1999). A coordenação destas várias respostas de defesa das plantas tem sido cuidadosamente estudada em vários sistemas (GRAHAM e GRAHAM, 1999). A partir destes estudos, tornou-se claro que a regulação das várias respostas celulares envolve um conjunto muito complexo e a interacção de sinais provenientes do agente patogénico, do ambiente e do próprio hospedeiro (GRAHAM e GRAHAM, 1999). Numa última fase, verificou-se que o hospedeiro tem um papel muito activo na orquestração das suas reacções de defesa através da produção de sinais que

simultaneamente iniciam e condicionam as respostas de populações de células específicas (GRAHAM e GRAHAM, 1999). Estudos recentes em várias espécies vegetais sugeriram que os processos de sinalização associados com a RH ou iniciados durante a RH podem programar ou condicionar activamente reacções RAL e RAS (GRAHAM e GRAHAM, 1999). A morte celular é um evento induzido que conduz a um estado alterado de alerta de uma célula ou de uma população de células relativamente a um sinal de defesa ou um indutor de sinal (GRAHAM e GRAHAM, 1999). Assim sendo, o condicionamento é o resultado da percepção de sinal e da própria via de transmissão de sinal que precede o envolvimento de indução de sinal de uma resposta de defesa *per se* (GRAHAM e GRAHAM, 1999).

Segundo SOMSSICH e HAHLBROCK (1998) as complexidades funcional, espacial e temporal da defesa a agentes patogénicos nas plantas, estão-se a tornar cada vez mais evidentes. A complexidade funcional começa com sinais exógenos alegadamente do agente patogénico, continua com os mecanismos de percepção da transmissão de sinal, e resulta numa extensa reprogramação do metabolismo celular, envolvendo grandes alterações na actividade dos genes (SOMSSICH e HAHLBROCK, 1998). A organização espacial destas reacções é igualmente complexa e afecta a compartimentação intracelular, o destino das células, e, finalmente, dos tecidos que envolvem o local da infecção (SOMSSICH e HAHLBROCK, 1998). A natureza altamente dinâmica da resposta adiciona complexidade temporal (SOMSSICH e HAHLBROCK, 1998). Assim, a defesa a agentes patogénicos requer uma grande alteração na actividade metabólica, em vez da alteração da expressão de apenas alguns genes relacionados com a defesa (SOMSSICH e HAHLBROCK, 1998). A complexidade observada funciona como um paradigma da flexibilidade e plasticidade do metabolismo das plantas (SOMSSICH e HAHLBROCK, 1998).

Segundo GRAHAM e GRAHAM (1999) para a soja (*Glycine max*) o modelo de funcionamento da competência para a indução de sinal de está representado na Fig. 5-3.

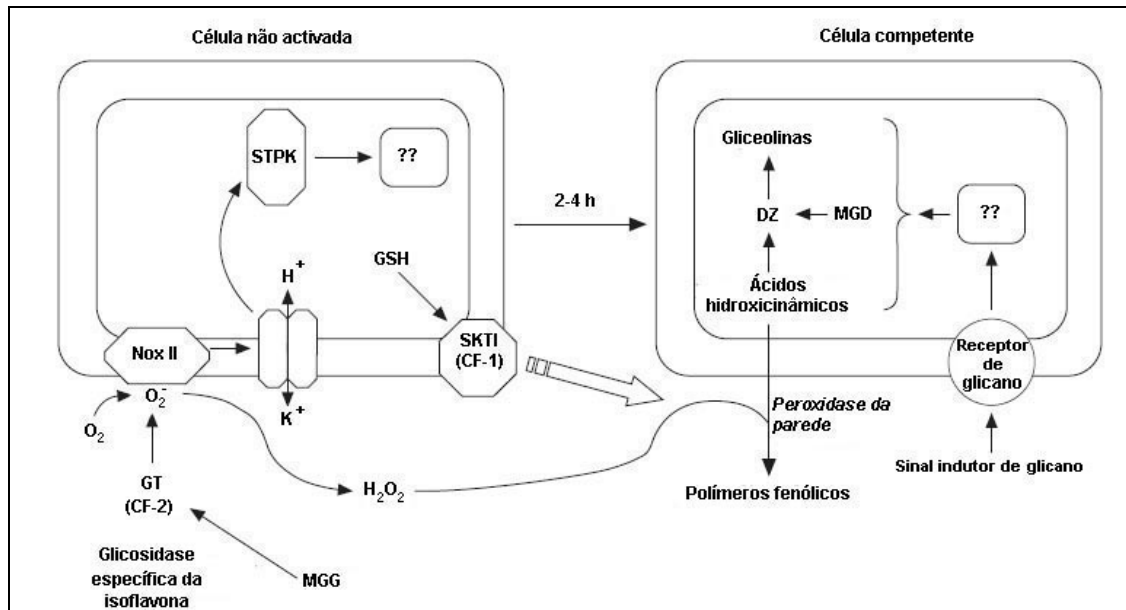


Fig. 5-3: Modelo de funcionamento da competência para a indução de sinal.
[Adaptado de GRAHAM e GRAHAM (1999)].

Segundo GRAHAM e GRAHAM (1999) a libertação do conjugado GT(CF-2) a partir do seu conjugado apoplástico malonilglicosilo, activa Nox II uma cascata de transmissão de sinal que, por um período de 2 a 4 horas, conduz à indução de gliceolina. A via biossintética CF-2 começa com Nox II que induz uma alcalinização generalizada do apoplasto e a activação de um acontecimento de fosforilação das proteínas de serina/treonina. A célula na esquerda está a ser sujeita a activação, enquanto que a da direita atingiu a competência e está a ser sujeita a indução de sinal mediada pelo glicano. Ainda se desconhece verdadeira alteração para a célula que estabelece competência para responder ao glicano. A activação da Nox II pelo GT também envolve a dismutação do superóxido pelo GT, conduzindo à produção de Peróxido de Hidrogénio. A activação da proteína CF-1 (SKTI) pela glutathiona reduzida (GSH) conduz à competência da indução de sinal, produção de polímeros fenólicos e à busca do Peróxido de Hidrogénio gerado pela Nox II/GT. Assim, pelo menos nas condições hipotéticas demonstradas na Fig. 5-4, as vias de competência CF-1 e CF-2 estão ligadas (GRAHAM e GRAHAM, 1999).

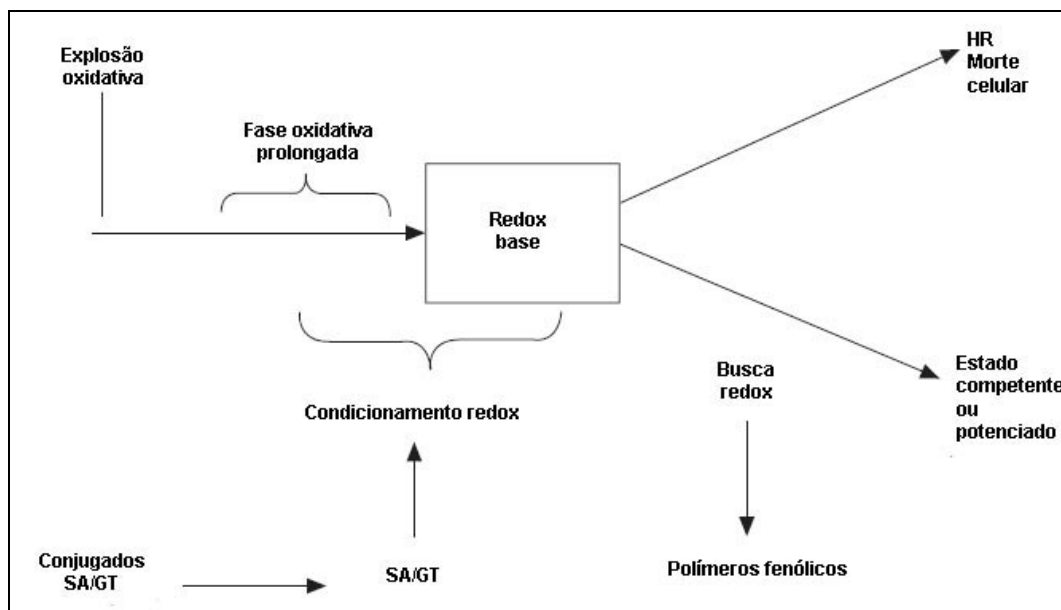


Fig. 5-4: Modelo de estabelecimento da competência e potenciamento da defesa. [Adaptado de GRAHAM e GRAHAM (1999)].

Ainda segundo GRAHAM e GRAHAM (1999), na Fig. 5-4 está representado o modelo geral para o estabelecimento da competência e potenciamento da defesa. O plano de morte celular programada hipersensível prossegue através da explosão oxidativa (que ocorre em minutos) e da fase oxidativa prolongada (que ocorre durante várias horas) que conduzem a uma base redox (GRAHAM e GRAHAM, 1999). A magnitude, natureza e duração da fase oxidativa prolongada e da base redox são condicionadas pela SA ou GT, como é possível verificar na Fig. 5-4. Com magnitude e duração suficientes, a fase oxidativa prolongada conduz à resposta hipersensível de morte celular (GRAHAM e GRAHAM, 1999). A busca redox, através da dismutação do superóxido e/ou utilização do Peróxido de Hidrogénio para a produção de polímeros fenólicos “salva” a célula de morte celular e conduz para a competência da indução de sinal ou ao estado de defesa potenciado (GRAHAM e GRAHAM, 1999).

As plantas podem induzir reacções de defesa a uma vasta gama de agentes patogénicos como um resultado de exposições prévias a agentes patogénicos e vários *stresses* químicos e físicos. A resistência induzida é expressada localmente, no local da infecção ou sistemicamente, em zonas remotamente localizadas da zona inicial de infecção (MÉTRAUX, 2001).

5.1.1.9. Proteínas de defesa e proteínas indutoras de sinal

Segundo HOHL (1991), nas doenças causadas por *Phytophthora*, o material de adesão é produzido pelo fungo e é constituído por proteínas e/ou glicoproteínas e em alguns casos polissacarídeos. Ainda segundo este autor, existem fortes evidências da participação de

interacções tipo lectina-ligando na adesão de *Phytophthora* à superfície do hospedeiro. A detecção de receptores de indutores de sinal de origem fúngica (aderente a este ou libertado por este) na membrana plasmática do hospedeiro pressupõe a sua participação no processo de adesão (HOHL, 1991).

Qualquer enzima ou polipéptido vegetal que tenha importância nos mecanismos de resistência a um dado agente patogénico poderá ser usado para identificar o gene envolvido, e as homologias pesquisadas em cultivares susceptíveis e resistentes das mesmas espécies vegetais, ou em espécies não hospedeiras (BAILEY, 1986).

Entre os acontecimentos que estão envolvidos no processo da resposta hipersensível inclui-se o aumento da actividade de várias enzimas e a biossíntese *de novo* de proteínas típicas, denominadas proteínas relacionadas com a patogénese (PR-proteínas). Em geral, os processos de resistência induzida podem envolver a activação de mais de uma via de biossíntese (GOZZO, 2004).

A resposta hipersensível local dispara uma acumulação notável de ácido salicílico nas células contíguas e, mais gradualmente, em tecidos mais distantes enquanto toma parte uma expressão crescente de proteínas relacionadas com a defesa (PR) tanto nos tecidos locais e sistémico (GOZZO, 2004). Estas proteínas são específicas das plantas e incluem glicanases, quitinases e peroxidases, algumas das quais pode ter um papel na restrição do desenvolvimento de agentes patogénico bacterianos ou fúngicos via acção hidrolítica nas suas paredes celulares (GOZZO, 2004).

As espécies de *Phytophthora* e de *Pythium* segregam grandes quantidades de proteínas de 10 kDa denominadas “elicitinas”¹⁴ que podem funcionar como agentes de indução dos mecanismos de defesa das plantas. Estas proteínas podem também induzir uma resposta hipersensível (HR) que inclui a necrose das células vegetais, com diferentes níveis de toxicidade dependendo do seu pl. Estudos recentes mostram que estas proteínas indutoras de sinal funcionam como transportadoras de esterol (RODRIGUES *et al.*, 2002).

¹⁴ Elicitina: Entrada inexistente nos Dicionários da Língua Portuguesa (correntes e técnicos) consultados. Trata-se de um aportuguesamento da palavra de origem anglo-saxónica *elicitor*. Ao longo do texto o termo é referido como proteína indutora de sinal.

Pinto (1995) apresenta como possibilidade de tradução para a palavra anglo-saxónica *elicitor*, a palavra eliciador, derivada do verbo eliciar (cujo significado é fazer sair ou expulsar, esconjurando). *Elicio* palavra latina que significa fazer sair, evocar, tirar, arrancar, excitar, provocar, obter, atrair (Dicionário Latino-Português de Francisco Torrinha, Porto, Porto Editora, 1942, página 284). Ao longo do texto este segundo termo é referido como agente indutor de sinal.

5.2. METODOLOGIA

5.2.1. Condições de Cultura e de Inoculação

Tecido resistente e susceptível cresceu durante 4 semanas nos diferentes meios de cultura. Findo o período de crescimento do tecido, foi colocado um disco de 0,5 cm de diâmetro (origem da infecção) no centro da massa de tecido. A infecção foi conduzida pipetando 10 μL da suspensão de zoósporos para o disco de papel de filtro. Para os controlos procedeu-se do mesmo modo substituindo-se a suspensão de zoósporos por água destilada estéril. Os tecidos resistentes e susceptíveis, infectados e não infectado, foram a incubar numa estufa a $22^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, na escuridão. O tecido infectado e não infectado foi colhido diariamente ao longo de 7 dias. No processo de colheita recorreu-se ao congelamento rápido das amostras em azoto líquido, redução a pó (por meio de um moinho de café) e posterior armazenamento num congelador a -20°C .

5.2.2. Meios de Cultura Utilizados para o Tecido Caloso

Depois de estabelecidos os clones resistentes e susceptíveis procedeu-se à avaliação da influência dos reguladores de crescimento na infecção. Após quatro semanas de crescimento no meio e nas condições descritas no Capítulo 2, procedeu-se às transferências dos tecidos resistente e susceptível para meios de culturas com diferentes razões entre auxina e citocinina (Tabela 5-1). Com o objectivo de determinar qual o tipo de contribuição dos reguladores de crescimento nos mecanismos de resistência ao fungo, prepararam-se nove meios com composição auxina/citocinina diferentes apresentados na tabela que se segue.

Tabela 5-1: Composição auxina/citocinina para análise da contribuição dos reguladores de crescimento nos mecanismos de resistência.

NAA(mgL^{-1}) BAP (mgL^{-1})	1,000 (5,37 μM)	1,500 (8,06 μM)	2,000 (10,74 μM)
0,100 (0,44 μM)	MTC-1	MTC-2	MTC-3
0,500 (2,22 μM)	MTC-4	MTC-5	MTC-6
1,000 (4,44 μM)	MTC-7	MTC-8	MTC-9

Após cada observação diária procedeu-se ao congelamento em azoto líquido, pulverização, etiquetagem e armazenamento dos tecidos a -20° C, para posterior análise por electroforese capilar e por electroforese em SDS-PAGE.

5.2.3. Análises por Electroforese Capilar

Procedeu-se à análise de amostras controlo e infectadas por electroforese capilar para aniões e catiões, num QuantaTM 4000 da Waters®, a 24° C. Para os aniões e os catiões, foram utilizados tubos capilares de 45 µm, com cerca de 45 cm de comprimento. Este tubo capilar foi adquirido em porções de 8 m (BIO-RAD®), em cada ensaio foi cortado um segmento de capilar (45 cm) e no terminal de saída da separação, a cerca de 7,5 cm, a cobertura do capilar era, cuidadosamente, queimada e limpa com algodão embebido em acetona, por forma a obter-se uma “janela” para as leituras. O QuantaTM 4000 procede à leitura e à detecção dos iões em solução por alteração dos padrões de absorção na região ultravioleta do espectro.

5.2.3.1. Preparação do material biológico para análise

A análise por electroforese capilar (EC) foi conduzida, pesando cerca de 100 mg de peso fresco de material vegetal, previamente pulverizado, e homogeneizando o material, num microtubo de 1500 µL em 800 µL de água ultrapura por meio de pilão em Teflon® acoplado a um berbequim comum. O homogeneizado foi centrifugado a 12 000 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e filtrado por microfiltro de poro 0,20 µm em PTFE (Sartorius®). A solução resultante foi, então, diluída 10 x, em água ultrapura filtrada por membrana de poro 0,20 µm em PTFE (Sartorius®). As amostras assim preparadas foram analisadas por electroforese capilar para aniões e catiões, num QuantaTM 4000 da Waters®, a 24° C.

5.2.3.2. Preparação dos padrões

Os padrões foram preparados com água ultrapura (Milli Q®) e posteriormente foram filtrados por membrana de poro 0,20 µm em PTFE (Sartorius®). Os sais utilizados para os padrões eram de qualidade pró-análise.

5.2.3.3. *Electroforese capilar de aniões*

Procedeu-se à análise de aniões (Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , NO_2^- , HPO_4^{2-} , F^- e ião oxalato) por electroforese capilar (EC), num Quanta™ 4000, Waters®, recorrendo ao electrólito Waters IonSelect™ High Mobility Anion Electrolyte Kit®. O aparelho de EC possui um contentor, com vinte posições, para vinte microtubos de 500 μL . No centro deste contentor existem quatro vasos, para purga do capilar, contendo electrólito. Na posição 1 e 11 do contentor eram, colocados microtubos de 500 μL com um padrão (10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ dos aniões a analisar), nas restantes posições (2-10 e 12-20) microtubos de 500 μL contendo amostra. O tempo de corrida das amostras e dos padrões foi de 7 min.. O tempo de purga do capilar, entre cada análise, foi de 5 min.. Cada separação foi feita com 30 μL de solução a analisar, forçados a entrar no capilar por meio de bomba de vácuo disparada automaticamente pelo aparelho de EC.

5.2.3.4. *Electroforese capilar de catiões*

A análise de catiões (Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+}) por electroforese capilar foi conduzida num Quanta™ 4000, Waters®, recorrendo ao electrólito Waters IonSelect™ Low Mobility Cation Electrolyte Kit®. O tempo de corrida das amostras foi de 5 min. e o tempo de purga do capilar de 3 min. entre cada análise. Na posição 1 e 11 do contentor eram, colocados microtubos de 500 μL com um padrão (10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ dos catiões a analisar), nas restantes posições (2-10 e 12-20) microtubos de 500 μL contendo amostra. Cada separação foi feita com 30 μL de solução a analisar, forçados a entrar no capilar por meio de bomba de vácuo disparada automaticamente pelo aparelho de EC.

5.2.4. **Extracção de Proteínas**

Cerca de 0,300 mg das amostras (dos tecidos resistente e susceptível, infectados e não infectados e a crescerem nos diferentes meios) previamente reduzidas a pó, foram colocados a uma temperatura entre 0-4° C, durante 1 h. Findo o tempo de descongelamento, procedeu-se à homogeneização em tampão de extracção, a 4° C. Experimentaram-se vários tampões de extracção tendo sido escolhido tampão de extracção BORDACS e KORANKI (1993), com algumas modificações: 20% de sacarose, 5,0% de 2-mercapto-etanol, 2,0% de Mono dodecil sulfato de sódio (SDS), em 50 mM de Hidroclorato de tris (hidroximetil) aminometano (Tris-HCl), a pH 6,5. Na altura da extracção foi preparada uma solução com vários inibidores de proteases [Fluoreto de

fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM, EDTA 2 mM, Leupeptina $1,9 \times 10^{-3}$ mg.mL⁻¹, Benzamidina 9 mM, Pepstatina A $6,25 \times 10^{-3}$ mg.mL⁻¹ e Aprotinina $2,3 \times 10^{-2}$ mg.mL⁻¹) que era adicionada ao tampão de extracção. Após a homogeneização, procedeu-se à cozedura das amostras a 100° C, durante 10 min. e posterior centrifugação a 14000 g, a 4° C, durante 15 min.. O sobrenadante foi recolhido para quantificação das proteínas totais e para separação em SDS-PAGE.

5.2.5. Procedimentos para a Elaboração de Geles de Poli-Acrilamida

A matriz de electroforese é formada pela polimerização do radical livre da acrilamida e de um co-monómero ligante. A fiabilidade dos resultados de electroforese depende da reprodutibilidade desta reacção, pelo que recorrer a reagentes de base de alta pureza é um factor importante na qualidade do gel. Tendo em conta este princípio recorreu-se à utilização de geles pré-fabricados pela BIO-RAD®, designadamente, o produto Precast Ready Gels® a 15%. Os resultados da aplicação desta metodologia não se registaram vantajosos para o material biológico em questão, por se ter verificado a necessidade da utilização de um gel concentrador antes da separação dos peptídeos. Por esse motivo para a produção dos geles recorreu-se à Solução Acrylamid/Bis® produzida pela BIO-RAD® que é feita a partir de acrilamida e bisacrilamida de pureza 99,9% e está disponível em duas concentrações (30 e 40%) e com três rácios de ligante 19:1, 29:1 e 37,5:1. No estudo em causa foi utilizada a concentração de 40% com o rácio de ligante de 37,5:1. A solução de Acrylamid/Bis® é fornecida em modo pronto a usar. Os reagentes de alta pureza são cuidadosamente controlados no processo de fabrico, permitindo que esta solução seja estável durante 1 ano a uma temperatura de 4° C.

Foram preparadas soluções de armazenamento concentradas para a elaboração dos geles:

- A solução de SDS 10% foi preparada dissolvendo 10 g de SDS em 100 mL de água bidestilada. Esta solução pode ser armazenada à temperatura ambiente, por um período até 6 meses.
- A solução de persulfato de amónio 10% (iniciador) foi preparada dissolvendo 0,1 g de persulfato de amónio (MM 228,20 g) em água bidestilada e perfazendo até 1 mL. Esta solução deverá ser preparada de fresco sempre que se proceder à preparação dos geles.
- A solução de tampão de separação 4x (1,5 M Tris-Cl, pH 8,8) foi preparada dissolvendo 36,3 g de Tris (MM 121,1 g) em 150 mL de água bidestilada. O pH 8,8 era ajustado com HCl concentrado e a solução aferida até 200 mL com água bidestilada. Esta solução pode ser armazenada no escuro, a 4° C, até 3 meses.

- A solução de tampão do gel concentrador (0,5 M Tris-Cl, pH 6,8) foi preparada dissolvendo 3,0 g de Tris (MM 121,1 g) em 40 mL de água bidestilada. O pH 6,8 era ajustado com HCl concentrado e a solução aferida até 50 mL com água bidestilada. Esta solução pode ser armazenada no escuro, a 4° C, até 3 meses.
- A solução de tampão de cobertura (0,375 M Tris-Cl, 0,1% SDS, pH 8,8) foi preparada dissolvendo 25 mL de tampão de separação 4x, 1 mL de SDS a 10% e aferindo com água bidestilada até 100 mL. Esta solução pode ser armazenada no escuro, a 4° C, até 3 meses.
- A solução de tampão de tratamento 4x [0,125 M Tris-Cl, 4% SDS, 20% v/v glicerol, 0,2 M de DTT (Ditiotreitol), 0,02% de azul de bromofenol, pH 6,8) foi preparada dissolvendo 5 mL de tampão do gel concentrador 4x, 8,0 mL de SDS a 10%, 4,0 mL de glicerol, 4,0 mg de azul de bromofenol. A solução era aferida até 10,0 mL com água bidestilada. Esta solução era armazenada em alíquotas de 0,5 mL a -20° C, até 6 meses.
- A solução de tampão do tanque (0,025 M Tris-Cl, 0,1% SDS, 0,192 M glicina, pH 8,3) foi preparada dissolvendo 30,28 g de Tris (MM 121,1 g), 144,13 g de glicina e 10 g de SDS. A solução foi aferida até 10 L com água bidestilada e armazenada à temperatura ambiente por um período até um mês.
- A solução de n-butanol saturado com água foi preparada adicionando 50 mL de n-butanol a 5 mL de água bidestilada. O frasco contendo a mistura era agitado e deixado a repousar. A fase superior era utilizada para cobrir os geles. O armazenamento era feito à temperatura ambiente, por um período indefinido.
- Como reagentes adicionais foram utilizados os padrões de peso molecular das proteínas e o N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamino (TEMED).

5.2.6. Condições da Electroforese em SDS-PAGE

Os péptidos presentes no tecido caloso foram separados em geles de poli-acrilamida, sob condições desnaturantes (SDS), em sistema vertical, segundo o método descrito por Laemmli (1970). Foi utilizado um sistema de mini-geles da BIO-RAD (Mini-PROTEAN 3 Cell and Systems, BIO-RAD®), os geles tinham uma espessura de 0,75 mm, 10 poços com capacidade de 30 µL e eram preparados imediatamente antes de se proceder à electroforese.

Para a obtenção dos perfis peptídicos procedeu-se ao método de electroforese em SDS-PAGE. Os geles eram constituídos por um gel de concentração seguido de gel de resolução.

Na Tabela 5-2 está sumariada a composição de dois geles de empacotamento experimentados para a obtenção do perfil proteico.

Tabela 5-2: Preparação de 5 mL de gel de concentração. Foram experimentadas duas concentrações de gel (4 e 18% de monómero).

Composição	4%	18%
Solução Monómero (BIO-RAD®)	500 µL	2,25 mL
Tampão gel empacotamento 4x	1,25 mL	2,5 mL
SDS 10%	50 µL	100 µL
Água bidestilada	3,15 mL	1,4 mL
Persulfato de Amônio 10%	75µL	100 µL
TEMED	8µL	6 µL

Na Tabela 5-3 apresentam-se as concentrações experimentadas (7,5-18%) para a preparação do gel de resolução. Para cada gel eram preparados 10 mL de cada uma das misturas apresentadas na tabela que se segue.

Tabela 5-3: Preparação de 10 mL de gel de resolução. Foram experimentadas várias concentrações de gel (7,5 a 18% de monómero).

Composição	7,5%	10%	12,5%	15%	18%
Solução Monómero (BIO-RAD®)	1,875 mL	2,5 mL	3,125 mL	3,75 mL	4,5 mL
Tampão gel separação 4x	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
SDS 10%	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Água bidestilada	5,425 mL	4,8 mL	4,175 mL	3,55 mL	2,8 mL
Persulfato de Amônio 10%	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
TEMED	8 µL	8 µL	8 µL	8 µL	8 µL

As experiências preliminares provaram que a combinação mais eficaz para a obtenção dos perfis peptídicos era de 4% para o gel de concentração e de 18% para o gel de resolução. O gel de concentração era preparado da seguinte forma: Solução de monómero; tampão do gel de concentração 4x; 10% de SDS; água destilada; persulfato de amônio a 10%, TEMED. O gel de resolução era preparado da seguinte forma: Solução de monómero; tampão do gel de concentração 4x; 10% de SDS; água destilada; persulfato de amônio a 10%, TEMED Na altura de carregar os poços misturavam-se as amostras com tampão de tratamento [125 mM Tris-Cl, 4% SDS, 20% de glicerol, 0,02% de azul de bromofenol, pH 6,8, segundo método de CHRAMBACH e RODBARD (1971)] numa proporção de 3:1. O tampão de tratamento era igualmente adicionado aos padrões de proteínas na proporção de 25 µL de tampão para 5 µL de padrão e continha azul de bromofenol que foi usado como marcador da frente de migração da electroforese. Os padrões utilizados foram Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range® e Kaleidoscope Standards Prestained Standards® da BIO-RAD® (Tabela 5-4). A electroforese foi conduzida numa tina de mini-geles contendo tampão [25 mM Tris-Cl, 192 mM Glicina, 0,1% SDS, pH 8,3, segundo método de CHRAMBACH e RODBARD (1971)], a uma intensidade constante de 40 mA (20 mA para cada gel). A electroforese prosseguia até que a frente de avanço do marcador atingisse cerca de 0,5 cm do limite do gel.

Tabela 5-4: Composição dos padrões de pesos moleculares utilizados nas separações de SDS PAGE.

Proteína	Kaleidoscope Standards Prestained Standards	Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range
Miosina	202,000	209,000
Beta-galactosidase	133,000	124,000
BSA (Albumina Sérica de Bovino)	71,000	80,000
Ovalbumina	-	49,100
Anidrase carbónica	41,800	34,800
Inibidor da tripsina da soja	30,600	28,900
Lisozima	17,800	20,600
Aprotinina	6,900	7,100

As bandas de proteínas foram visualizadas recorrendo ao Kit Coomassie Brilliant Blue R-250 (BIO-RAD®, constituído por solução de coloração Coomassie Brilliant Blue R-250 e solução de descoloração para o Coomassie Brilliant Blue R-250). O período de coloração dos geles com a primeira solução decorreu durante 24 h, seguida de descoloração com a segunda solução até que fosse obtido um contraste óptimo entre as bandas e o fundo do gel. Em seguida procedeu-se à secagem dos geles num secador de geles a 60° C durante 3 a 6 horas (consoante o número de geles colocados simultaneamente a secar).

Os geles foram digitalizados e posteriormente analisados através do programa informático Gel-Pro Analyzer 4,5 (Media Cybernetics®, L.P., USA).

5.2.7. Recolha e Tratamento de Dados

5.2.7.1. Cotação do crescimento fúngico

Após a inoculação das culturas, e durante sete dias, procedeu-se à contabilização do crescimento fúngico, por aplicação do método descrito por HELGESON *et al.* (1972). As culturas foram, então, avaliadas relativamente ao grau de crescimento fúngico estabelecendo como critério de pontuação os seguintes parâmetros: 0 – micélio não visível; 1 – algum micélio aéreo; 2 – crescimento localizado; 3 – colonização moderada; 4 – colonização extensiva; 5 – tecido caloso envolvido numa manta micelial. Para determinar a cotação do crescimento fúngico em cada dia de incubação recorreu-se à fórmula:

$$CCF = \frac{(N_0 \times 0 + N_1 \times 1 + N_2 \times 2 + N_3 \times 3 + N_4 \times 4 + N_5 \times 5)}{NT}, \text{ onde}$$

CCF - Cotação do Crescimento Fúngico

N_n - Número de tecidos com a pontuação n (igual a 0, 1, 2, 3, 4 ou 5)

NT - Número Total de tecidos ensaiados

Os resultados obtidos foram analisados pelo programa estatístico SPSS® (Versão 13.0, para Windows). Nas Fig. 5-5 e Fig. 5-6 estão representadas as cotações do crescimento fúngico, numa combinação de nove meios de cultura distintos (nove gráficos de barras representados a três dimensões), para o tecido caloso susceptível e resistente, respectivamente. Estes gráficos foram construídos recorrendo à ferramenta informática Excel (Versão 2003, para ambiente Windows).

5.2.7.2. Electroforese capilar de catiões

Os electroferogramas obtidos em cada análise por EC foram integrados recorrendo ao “Software” Millenium, da Waters®, que acompanha o aparelho de EC Quanta™ 4000. A utilização desta ferramenta informática permitiu a identificação e quantificação dos iões em solução, por meio do tempo de retenção em minutos e da área ($\mu\text{V} \cdot \text{seg}$) de cada pico obtido, respectivamente. A quantificação em $\mu\text{g/g.p.f.}$ foi obtida recorrendo a uma grelha de cálculo de Excel, tendo por referência as áreas dos picos obtidos pela análise por EC dos padrões.

Para a quantificação dos iões separados por electroforese capilar dos clones Susceptível e Resistente de tecido caloso a crescer em nove meios diferentes (no que respeita à composição em fitorreguladores) recorreu-se ao programa informático, que acompanha o sistema de separação. Os electroferogramas obtidos em cada análise por EC foram integrados recorrendo ao “Software” Millenium, da Waters®. A utilização desta ferramenta informática permitiu a identificação e quantificação dos iões em solução, a partir do tempo de retenção em minutos e da área ($\mu\text{V} \cdot \text{seg}$) de cada pico obtido, respectivamente. A quantificação em $\mu\text{g/g.p.f.}$ foi obtida recorrendo a uma grelha de cálculo de Excel, tendo por referência as áreas dos picos obtidos pela análise por EC dos padrões para cada ião analisado. Os resultados assim obtidos foram analisados pelo programa estatístico SPSS® (Versão 13.0, para Windows),.

Para a análise estatística foi utilizado um mínimo de três ensaios independentes para cada condição (meio de cultura/tempo de incubação/tipo de clone). Para explicar a interferência da invasão, provocada pelo agente patogénico *Phytophthora cinnamomi*, foram cruzados os valores das concentrações dos iões ($\mu\text{g/g.p.f.}$), obtidos pela análise por electroforese capilar, com as cotações do crescimento fúngico. Este último parâmetro permite perceber a amostra do ponto de vista temporal (número de dias de incubação) e do ponto de vista da capacidade invasora por parte do fungo, ou em alternativa, da capacidade de resistência por parte do tecido caloso. Nos gráficos para cada tipo de clone estão representadas sete cotações do crescimento fúngico, que correspondem aos dias de interacção 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7. Os resultados obtidos foram analisados pelo programa estatístico SPSS® (Versão 13.0, para Windows), a partir do qual foram construídos os gráficos interactivos de linhas, com as barras de erro associadas. Os gráficos interactivos resultam agrupados numa única figura que é a combinação de um painel de nove gráficos (nove meios de cultura) nos quais estão representados os valores médios relativos à concentração de

cada um dos iões ($\mu\text{g/g.p.f.}$) em função da cotação do crescimento fúngico) (Fig. 5-7 a Fig. 5-18).

A estatística descritiva (Tabela 5 6, Tabela 5 7, Tabela 5 9, Tabela 5 11, Tabela 5 13, Tabela 5 15, Tabela 5 17, Tabela 5 19, Tabela 5 21, Tabela 5 23, Tabela 5 25, Tabela 5 27 e Tabela 5 29) e os testes não-paramétricos de Wilcoxon (Tabela 5 8, Tabela 5 10, Tabela 5 12, Tabela 5 14, Tabela 5 16, Tabela 5 18, Tabela 5 20, Tabela 5 22, Tabela 5 24, Tabela 5 26, Tabela 5 28 e Tabela 5 30) foram, igualmente, executadas recorrendo ao programa estatístico SPSS® (Versão 13.0, para Windows).

No que respeita à análise inferencial, antes de se realizarem os testes estatísticos, procedia-se à verificação da normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e à homogeneidade das variâncias (teste de Levene) da amostra no sentido de saber se era possível aplicar testes paramétricos ou não-paramétricos. No caso da amostra em estudo, e em relação à maioria das variáveis, ou não seguia uma distribuição normal, ou não era homogénea ou então era demasiadamente pequena para serem utilizados os testes paramétricos. Por esses motivos os testes aplicados são de natureza não paramétrica (MAROCO, 2003).

O teste não-paramétrico de Wilcoxon foi utilizado uma vez que as amostras não possuíam uma distribuição normal, mesmo após transformação dos dados. É aceite, em geral, que os testes não-paramétricos são menos potentes que os correspondentes testes paramétricos, quando aplicados a amostras de grande dimensão e de dimensão igual entre si (MAROCO, 2003). Contudo os testes não-paramétricos chegam a ser mais robustos para amostras de pequena e diferente dimensão, como é o caso da amostra em estudo (MAROCO, 2003).

5.2.7.3. Electroforese em gel de poli-acrilamida

Para avaliar os perfis peptídicos na interacção dos clones (resistente e susceptível), sujeitos a diferentes regimes hormonais (MTC-1 a MTC-9), com o agente patogénico *P. cinnamomi* quantificou-se a totalidade das bandas nos geles de SDS-PAGE e seguidamente avaliou-se a distribuição das bandas por cinco classes de pesos moleculares. Os perfis peptídicos totais foram determinados pelo programa informático Gel-Pro Analyzer (Versão 4,5; Media Cybernetics). Após a determinação dos pesos moleculares de cada banda nos geles de SDS-PAGE, a quantidades de bandas foram enquadradas em cinco classes tendo em conta o limite de resolução do gel, designadamente:

- Classe 1 – entre 5 e 13 kDa (isto é,]5 – 13] kDa);
- Classe 2 – entre 13 e 40 kDa (isto é,]13 – 40] kDa);
- Classe 3 – entre 40 e 60 kDa (isto é,]40 – 60] kDa);
- Classe 4 – entre 60 e 100 kDa (isto é,]60 – 100] kDa);
- Classe 5 – entre 100 e 205 kDa (isto é,]100 – 205] kDa).

Os tecidos (resistente e susceptível) cresceram durante 4 semanas em nove meios com composição diferente no que concerne à composição em fitorreguladores. Foram, então, inoculados com 10 µL de uma suspensão de zoósporos e a infecção foi seguida por um período de 7 dias. As amostras para a análise dos perfis peptídicos foram recolhidas no final do primeiro, quarto e sétimo dia de interacção. As extracções peptídicas foram colocadas em mini-geles de SDS-PAGE. Os geles foram sujeitos a electroforese numa intensidade constante de 40 mA (20 mA para cada gel) que prosseguiu até que a frente de avanço do marcador atingisse cerca de 0,5 cm do limite do gel. Os geles foram corados recorrendo ao Kit Coomassie Brilliant Blue R-250 (de forma a evidenciar as bandas peptídicas), em seguida foram desidratados e finalmente foram digitalizados. Os geles digitalizados foram analisados através do programa informático Gel-Pro Analyzer 4,5 (Media Cybernetics®, L.P., USA). Da análise resultante deste programa informático obtiveram-se folhas de cálculo nas quais figuravam os pesos moleculares das bandas visualizadas nos geles (para cada gel obteve-se uma folha de cálculo).

Para a análise estatística foi utilizado um mínimo de três ensaios independentes para cada condição (meio de cultura/tempo de incubação/tipo de clone). Os resultados obtidos foram analisados pelo programa estatístico SPSS® (Versão 13.0, para Windows), a partir do qual foram construídos os gráficos interactivos de linhas, com as barras de erro associadas. Os gráficos interactivos resultam agrupados numa única figura que é a combinação de um painel de nove gráficos (nove meios de cultura) nos quais estão representados os valores médios relativos ao número de bandas em função da cotação do crescimento fúngico) (Fig. 5-19 a Fig. 5-24).

A estatística descritiva (Tabela 5 6, Tabela 5 7, Tabela 5 9, Tabela 5 11, Tabela 5 13, Tabela 5 15, Tabela 5 17, Tabela 5 19, Tabela 5 21, Tabela 5 23, Tabela 5 25, Tabela 5 27e Tabela 5 29) e os testes não-paramétricos de Wilcoxon (Tabela 5 8, Tabela 5 10, Tabela 5 12, Tabela 5 14, Tabela 5 16, Tabela 5 18, Tabela 5 20, Tabela 5 22, Tabela 5 24, Tabela 5 26, Tabela 5 28 e Tabela 5 30) foram, igualmente, executadas recorrendo ao programa estatístico SPSS® (Versão 13.0, para Windows). O teste não-paramétrico de Wilcoxon foi utilizado uma vez que as amostras não possuíam uma distribuição normal, mesmo após transformação dos dados (MAROCO, 2003). É aceite, em geral, que os testes não-paramétricos são menos potentes que os correspondentes testes paramétricos, quando aplicados a amostras de grande dimensão e de dimensão igual entre si (MAROCO, 2003). Contudo os testes não-paramétricos chegam a ser mais robustos para amostras de pequena e diferente dimensão (MAROCO, 2003), como é o caso da amostra em estudo.

A taxa de decréscimo do número de bandas foi calculada recorrendo à fórmula:

$$TDNTB = \left(\frac{NTBT_1 - NTBT_7}{NTBT_1} \right) \times 100, \text{ onde}$$

TDNTB – Taxa de Decréscimo do Número Total de Bandas

NTBT₁ – Número Total de Bandas no Tempo 1 (1º dia de interacção)

$NTBT_7$ – Número Total de Bandas no Tempo 7 (7º e último dia de interação)

5.2.7.4. Validade e fiabilidade dos testes estatístico

O limite de confiança aceite foi igual ou superior a 95%. Na avaliação do nível de significância o valor de p pode ser classificados em quatro grupos: sem significância; com significância entre 0,05 e 0,01; com significância entre 0,01 e 0,001 e; maior que 0,001. Assim de acordo com o representado na Tabela 5-5, temos:

Tabela 5-5: Correspondência do nível de significância com o resultado do teste estatístico e com a sinalética utilizada na apresentação de resultados.

Valor de p	Resultado do teste	Comentário	Sinalética
Maior que 0,05	Aceitar a Hipótese Nula (H_0)	Não há evidências para rejeitar H_0	NS
Entre 0,01 e 0,05	Rejeitar H_0 (Aceitar H_1)	Há algumas evidências para rejeitar H_0 (por isso aceitar H_1)	*
Entre 0,001 e 0,01	Rejeitar H_0 (Aceitar H_1)	Há uma forte evidência para rejeitar H_0 (por isso aceitar H_1)	**
Menor que 0,001	Rejeitar H_0 (Aceitar H_1)	Há uma evidência muito forte para rejeitar H_0 (por isso aceitar H_1)	***

Nas tabelas onde são apresentados os testes estatísticos a sinalética “NS” corresponde a não significativo, “*” pouco significativo, “**” significativo e “***” muito significativo.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Cotações do Crescimento Fúngico Sobre Tecido Caloso (Resistente e Susceptível) Submetido a Regimes Hormonais Diferenciados

O crescimento micelial sobre tecido caloso do clone resistente e susceptível (mantidos em nove meios diferenciados, no que aos fitorreguladores diz respeito) foi contabilizado recorrendo à escala de HELGESON *et al.* (1972) e está evidenciado nas Fig. 5-5 e Fig. 5-6. Nas páginas págs. 184 e 185 apresentam-se os gráficos com as cotações do crescimento fúngicos em nove meios de composição diferente no que diz respeito aos fitorreguladores.

O tecido susceptível mostra menor cotação fúngica nos meios MTC-1 (concentrações mínimas em auxina e citocinina), MTC-3 (concentração máxima em auxina e mínima em citocinina) e MTC-6 (concentração máxima em auxina e normal em citocinina). Nos meios MTC-8 (concentração normal em auxina e máxima em citocinina) e MTC-9 (concentração máxima em auxina e máxima em citocinina), a cotação do crescimento fúngico é aumentada, aparentando, os tecidos, uma reacção de maior susceptibilidade.

Contrariamente, o tecido resistente mostra menor cotação do crescimento fúngico nos meios MTC-2 (concentração normal em auxina e mínima em citocinina), MTC-3 (concentração máxima em auxina e mínima em citocinina), MTC-6 (concentração máxima em auxina e normal em citocinina), MTC-8 (concentração normal em auxina e máxima em citocinina) e MTC-9 (concentração máxima em auxina e máxima em citocinina). Nos meios MTC-4 (concentração normal em auxina e máxima em citocinina) e MTC-7 (concentração máxima em auxina e máxima em citocinina), a cotação do crescimento fúngico é aumentada, aparentando, os tecidos, uma reacção de maior susceptibilidade.

Da análise comparada da Fig. 5-5 e da Fig. 5-6 é possível deduzir que no tecido caloso susceptível e, nos meios MTC-1, MTC-3 e MTC-6, a cotação de crescimento fúngico apresenta valores menores, em termos absolutos, do que para qualquer teste com o tecido resistente. O tecido resistente mostra um padrão cotação do crescimento fúngico mais homogéneo que o tecido susceptível.

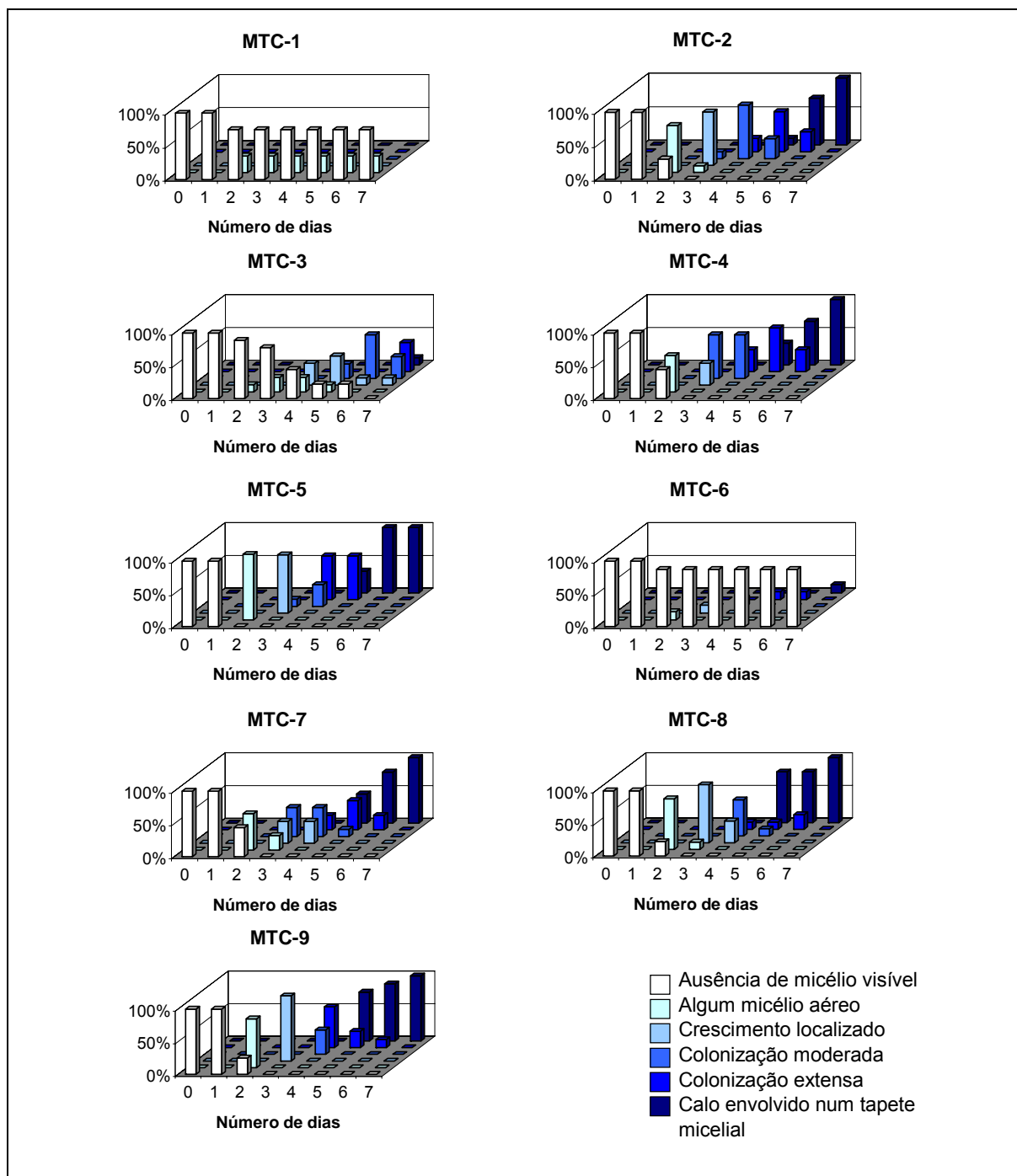


Fig. 5-5: Variação para a cotação do crescimento fúngico sobre tecido caloso susceptível, mantido em nove meios de cultura com composição auxina:citocinina diferente.

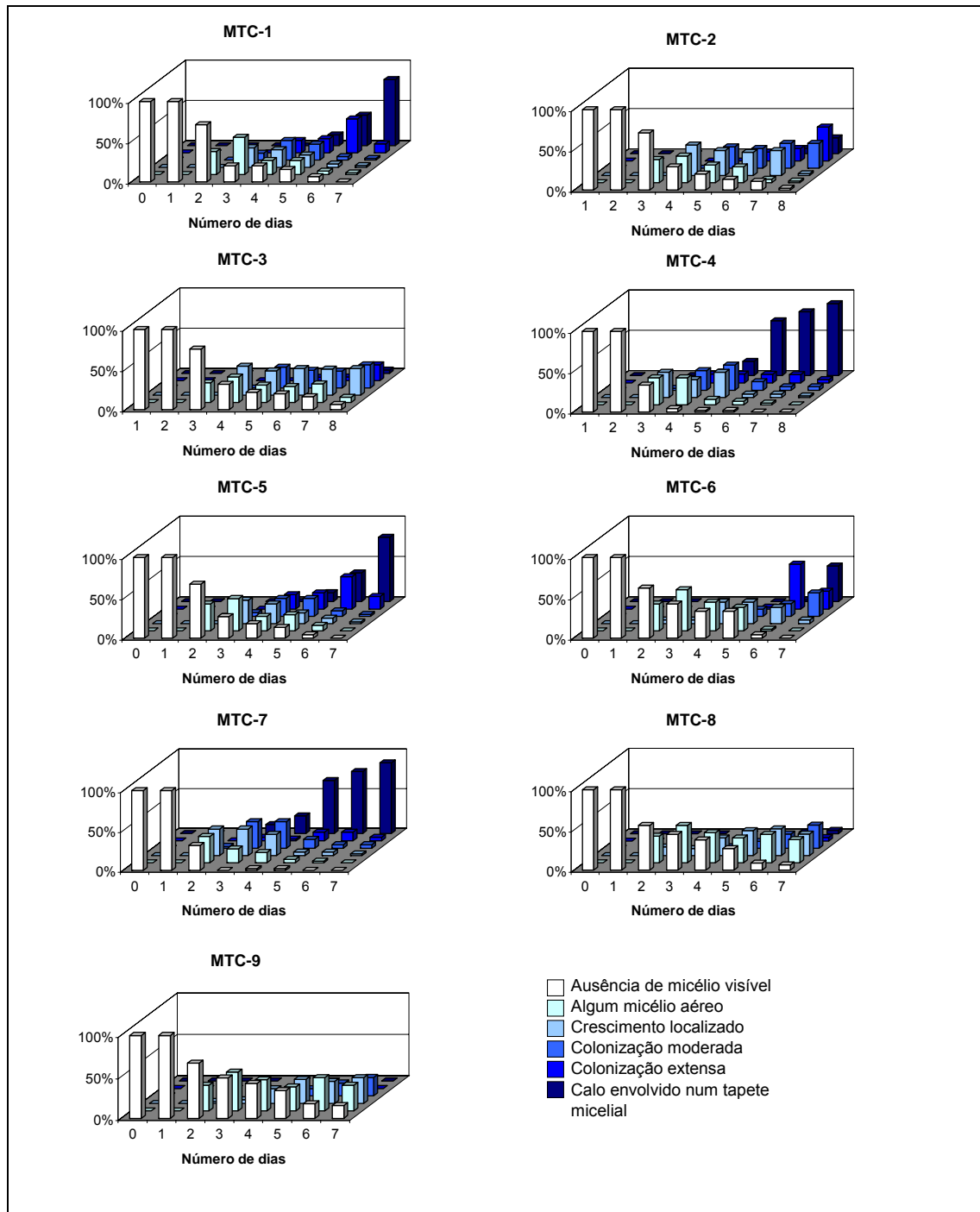


Fig. 5-6: Variação para a cotação do crescimento fúngico sobre tecido caloso resistente, mantido em nove meios de cultura com composição auxina:citocinina diferente.

5.3.2. Avaliação Quantitativa dos Iões Analisados por Electroforese Capilar

Na Tabela 5-6 apresenta-se a estatística descritiva absoluta (isto é, não tendo em consideração cada uma das variáveis independentes) para as concentrações dos cationes e dos anions analisados por Electroforese Capilar nos tecidos calosos (susceptível e resistente) infectados.

Tabela 5-6: Estatística descritiva absoluta para as concentrações dos iões analisados por Electroforese Capilar no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado.

Concentração (µg/g.p.f.)	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
NH_4^+	377	25,28767	49,560103	0,000	387,067
K^+	378	642,15315	211,260673	88,136	1401,697
Ca^{2+}	378	31,58430	14,100174	2,227	95,648
Na^+	378	74,11701	21,950890	23,526	146,895
Mg^{2+}	378	27,40044	11,876216	2,413	82,908
Cl^-	390	130,68879	46,757479	60,118	207,102
NO_2^-	390	5,62249	21,600263	0,255	168,661
SO_4^{2-}	390	184,48864	56,885277	88,887	294,789
NO_3^-	390	9,33677	31,333592	0,293	217,789
Oxalato	390	21,41576	25,070502	0,820	168,234
F^-	390	3,02249	12,377136	0,236	154,770
HPO_4^{2-}	390	283,05055	123,656119	136,021	600,450
CCF	393	1,94	1,734	0	5

Da análise da tabela anterior é possível constatar que para cada um dos iões foram obtidos mais de 370 quantificações, que correspondem ao mesmo valor em picos nos electroferogramas ($377 \leq N \leq 390$). Nos tecidos infectados, e em termos médios, a ordem decrescente de concentração dos iões era:



Com efeito os últimos cinco iões (NH_4^+ , Oxalato, NO_3^- , NO_2^- e F^-), com frequência ocorriam em quantidades nulas ou vestigiais.

5.3.2.1. Concentração em NH_4^+

Na Tabela 5-7 apresenta-se a estatística descritiva da concentração em NH_4^+ ($\mu\text{g/g.p.f.}$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Tabela 5-7: Estatística descritiva da concentração em NH_4^+ ($\mu\text{g/g.p.f.}$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Meio de cultura		Tipo de Clone	
		Resistente	Susceptível
MTC-1	Média	35,887	31,610
	Desvio Padrão	17,784	26,320
MTC-2	Média	32,663	0,960
	Desvio Padrão	25,683	0,706
MTC-3	Média	30,469	1,923
	Desvio Padrão	25,587	1,130
MTC-4	Média	39,168	1,116
	Desvio Padrão	29,116	1,517
MTC-5	Média	87,114	1,063
	Desvio Padrão	90,846	1,163
MTC-6	Média	71,837	2,556
	Desvio Padrão	71,466	2,670
MTC-7	Média	32,151	1,467
	Desvio Padrão	26,144	1,129
MTC-8	Média	30,673	1,893
	Desvio Padrão	26,451	1,702
MTC-9	Média	64,161	0,679
	Desvio Padrão	54,325	0,550

Da análise da tabela anterior é possível constatar que para o catião NH_4^+ os valores médios para os tecido resistente variavam de um mínimo de 30,469 (MTC-3) a um máximo de 87,114 $\mu\text{g/g.p.f.}$ (MTC-5), enquanto que para o tecido susceptível variavam de um mínimo de 0,679 (MTC-9) a um máximo de 31,610 $\mu\text{g/g.p.f.}$ (MTC-1). O desvio padrão associado a estes iões era de elevada grandeza.

Em termos médios a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente de concentração em NH_4^+ no tecido caloso resistente infectado era:

MTC-5 > MTC-6 > MTC-9 > MTC-4 > MTC-1 > MTC-2 > MTC-7 > MTC-8 > MTC-3

No que respeita ao tecido caloso susceptível infectado a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente de concentração em NH_4^+ era:

MTC-1 > MTC-6 > MTC-3 > MTC-8 > MTC-7 > MTC-4 > MTC-5 > MTC-2 > MTC-9

Na Fig. 5-7 estão representados nove gráficos (que correspondem a 9 combinações de fitorreguladores) de 377 valores obtidos para a concentração em NH_4^+ ($\mu\text{g/g.p.f.}$). Estes valores estão graficados em função da cotação do crescimento fúngico (0-5) e do tipo de meio de cultura

(MTC-1 a MTC-9).

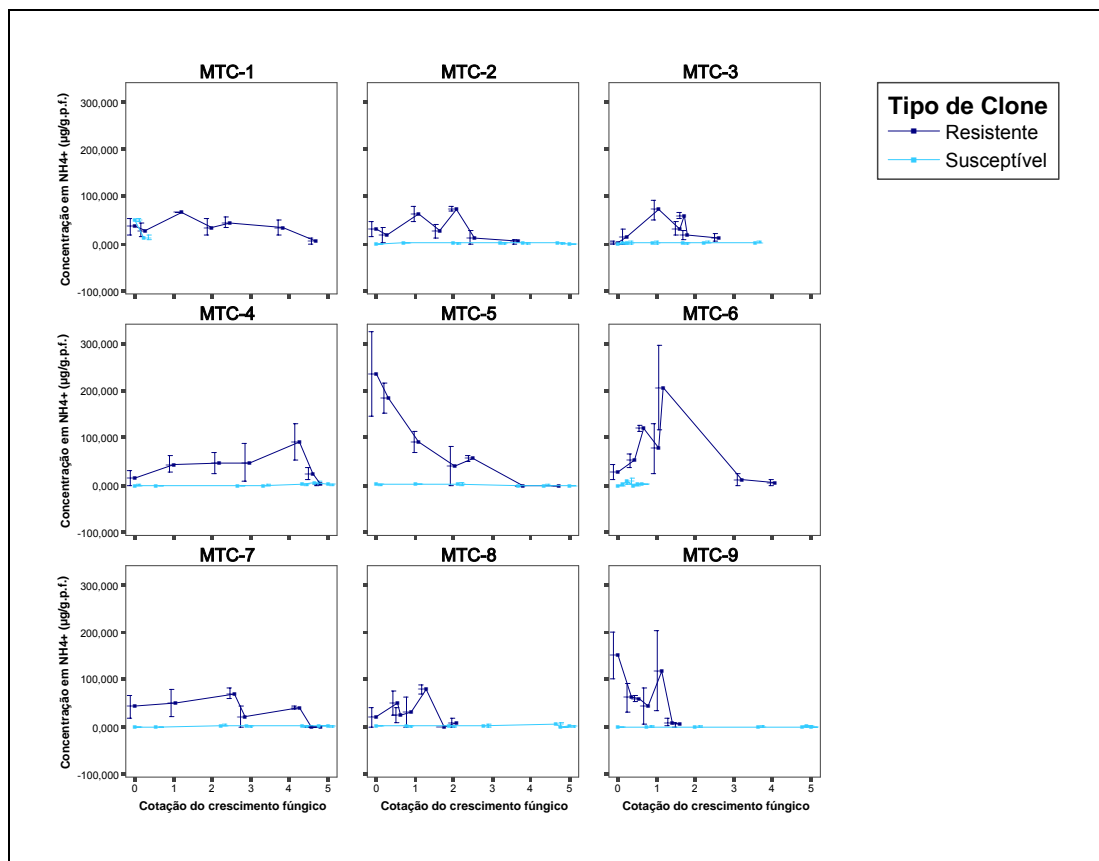


Fig. 5-7: Distribuição da concentração em NH_4^+ ($\mu\text{g/g.p.f.}$) em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura.

As barras de erro representam o valor da média somando e subtraindo do valor do desvio padrão ($\bar{x} \pm \text{DP}$).

Da análise da figura anterior é possível constatar que para o catião NH_4^+ existe em quantidades nulas ou vestigiais no tecido caloso susceptível infectado. É possível ainda sublinhar que a concentração deste catião é quase sempre superior no tecido resistente infectado.

Para testar se as diferenças de distribuição dos valores de concentração em NH_4^+ eram significativas foi aplicado o teste não-paramétrico para duas amostras emparelhadas de Wilcoxon apresentado na Tabela 5-8.

Tabela 5-8: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis concentração em NH_4^+ ($\mu\text{g/g.p.f.}$) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

	Z	Sig. assintótica (bilateral)
MTC-1	-4,396	0,000***
MTC-2	-1,256	0,209 ^{NS}
MTC-3	-2,882	0,004**
MTC-4	-0,977	0,329 ^{NS}
MTC-5	-1,117	0,264 ^{NS}
MTC-6	-3,977	0,000***
MTC-7	-0,335	0,738 ^{NS}
MTC-8	-0,0837	0,402 ^{NS}
MTC-9	-1,328	0,184 ^{NS}

Da análise da tabela anterior é possível verificar que, apesar das diferenças anteriormente assinaladas na Tabela 5-7 e Fig. 5-7, em apenas três meios de cultura as diferenças entre o tecido resistente e o susceptível são estatisticamente significativas, designadamente: MTC-1 ($p < 0,001$); MTC-6 ($p < 0,001$) e; MTC-3 ($p < 0,01$).

5.3.2.3. Concentração em K^+

Na Tabela 5-9 apresenta-se a estatística descritiva da concentração K^+ ($\mu\text{g/g.p.f.}$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Tabela 5-9: Estatística descritiva da concentração em K^+ ($\mu\text{g/g.p.f.}$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Meio de Cultura		Tipo de Clone	
		Resistente	Susceptível
MTC-1	Média	587,479	587,204
	Desvio Padrão	108,120	23,395
MTC-2	Média	676,223	627,008
	Desvio Padrão	151,772	148,641
MTC-3	Média	622,623	573,999
	Desvio Padrão	118,517	183,569
MTC-4	Média	621,945	638,011
	Desvio Padrão	166,290	159,782
MTC-5	Média	741,542	715,485
	Desvio Padrão	292,928	287,084
MTC-6	Média	717,042	643,197
	Desvio Padrão	193,695	202,087
MTC-7	Média	577,948	551,006
	Desvio Padrão	282,042	256,897
MTC-8	Média	646,128	651,050
	Desvio Padrão	120,562	108,222
MTC-9	Média	724,317	709,062
	Desvio Padrão	340,179	312,612

Da análise da tabela anterior é possível constatar que para o catião K^+ os valores médios

para os tecido resistente variavam de um mínimo de 577,948 (MTC-7) a um máximo de 741,542 $\mu\text{g/g.p.f.}$ (MTC-5), enquanto que para o tecido susceptível variavam de um mínimo de 551,006 (MTC-7) a um máximo de 715,485 $\mu\text{g/g.p.f.}$ (MTC-5).

Em termos médios a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente de concentração em K^+ no tecido caloso resistente infectado era:

MTC-5 > MTC-9 > MTC-6 > MTC-2 > MTC-8 > MTC-3 > MTC-4 > MTC-1 > MTC-7

No que respeita ao tecido caloso susceptível infectado a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente de concentração em K^+ era:

MTC-5 > MTC-9 > MTC-8 > MTC-6 > MTC-4 > MTC-2 > MTC-1 > MTC-3 > MTC-7

Na Fig. 5-8 estão representados nove gráficos (que correspondem a 9 combinações de fitorreguladores) de 378 valores obtidos para a concentração em K^+ ($\mu\text{g/g.p.f.}$). Estes valores estão graficados em função da cotação do crescimento fúngico (0-5) e do tipo de meio de cultura (MTC-1 a MTC-9).

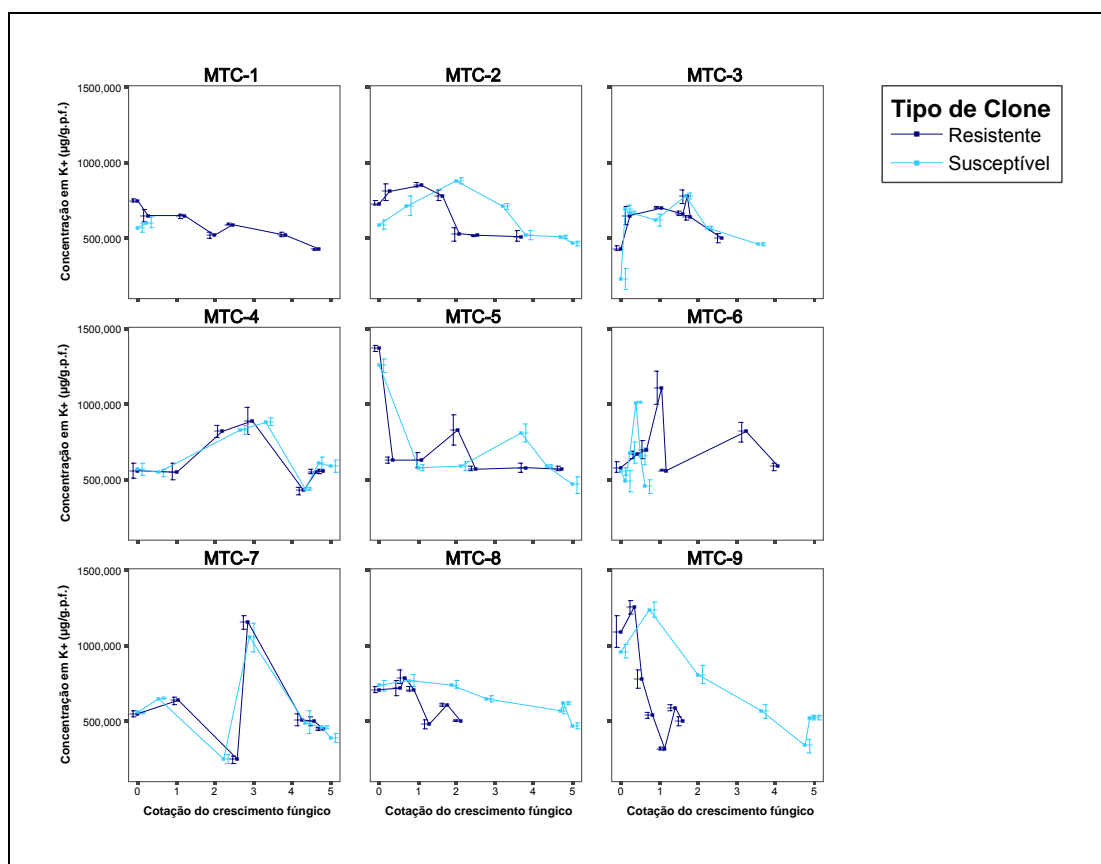


Fig. 5-8: Distribuição da concentração em K^+ ($\mu\text{g/g.p.f.}$) em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura. As barras de erro representam o valor da média somando e subtraindo do valor do desvio padrão ($\chi \pm \text{DP}$).

Da análise da figura anterior é possível constatar que para o catião K^+ existe em

quantidades elevadas no tecido caloso e que não parecem existir diferenças aparentes entre o tecido resistente e susceptível, isto é, em cada meio há um aparente sincronismo no padrão de distribuição da concentração deste catião entre os dois tipos de tecido (sobretudo nos meios MTC-2, 3, 4 e 7).

Para testar se as diferenças de distribuição dos valores de concentração em K^+ eram significativas foi aplicado o teste não-paramétrico para duas amostras emparelhadas de Wilcoxon apresentado na Tabela 5-10.

Tabela 5-10: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis concentração em K^+ ($\mu\text{g/g.p.f.}$) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

	Z	Sig. assintótica (bilateral)
MTC-1	-5,579	0,000***
MTC-2	-5,645	0,000***
MTC-3	-6,031	0,000***
MTC-4	-5,579	0,000***
MTC-5	-5,511	0,000***
MTC-6	-5,645	0,000***
MTC-7	-5,511	0,000***
MTC-8	-5,579	0,000***
MTC-9	-5,645	0,000***

Da análise da tabela anterior é possível verificar que, apesar de aparentemente não se verificarem grandes diferenças na Tabela 5-9 e Fig. 5-8, em todos os meios de cultura as diferenças entre o tecido resistente e o susceptível são estatisticamente muito significativas ($p < 0,001$).

5.3.2.3. Concentração em Ca^{2+}

Na Tabela 5-11 apresenta-se a estatística descritiva da concentração Ca^{2+} ($\mu\text{g/g.p.f.}$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Tabela 5-11: Estatística descritiva da concentração em Ca^{2+} ($\mu\text{g/g.p.f.}$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Meio de Cultura		Tipo de Clone	
		Resistente	Susceptível
MTC-1	Média	24,365	27,336
	Desvio Padrão	6,044	5,512
MTC-2	Média	37,804	38,490
	Desvio Padrão	14,713	17,475
MTC-3	Média	28,695	30,074
	Desvio Padrão	5,956	6,957
MTC-4	Média	32,597	32,106
	Desvio Padrão	4,487	5,733
MTC-5	Média	44,131	30,155
	Desvio Padrão	7,284	16,357
MTC-6	Média	31,992	33,033
	Desvio Padrão	13,832	14,534
MTC-7	Média	37,658	24,164
	Desvio Padrão	21,395	6,689
MTC-8	Média	33,925	31,333
	Desvio Padrão	10,052	9,178
MTC-9	Média	36,174	23,557
	Desvio Padrão	10,148	10,469

Da análise da tabela anterior é possível constatar que para o catião Ca^{2+} os valores médios para os tecido resistente variavam de um mínimo de 24,365 (MTC-1) a um máximo de 44,131 $\mu\text{g/g.p.f.}$ (MTC-5), enquanto que para o tecido susceptível variavam de um mínimo de 23,557 (MTC-9) a um máximo de 38,490 $\mu\text{g/g.p.f.}$ (MTC-2).

Em termos médios a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente de concentração em Ca^{2+} no tecido caloso resistente infectado era:

MTC-5 > MTC-2 > MTC-7 > MTC-9 > MTC-8 > MTC-4 > MTC-6 > MTC-3 > MTC-1

No que respeita ao tecido caloso susceptível infectado a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente de concentração em Ca^{2+} era:

MTC-2 > MTC-6 > MTC-4 > MTC-8 > MTC-5 > MTC-3 > MTC-1 > MTC-7 > MTC-9

Na Fig. 5-9 estão representados nove gráficos (que correspondem a 9 combinações de fitorreguladores) de 378 valores obtidos para a concentração em Ca^{2+} ($\mu\text{g/g.p.f.}$). Estes valores estão graficados em função da cotação do crescimento fúngico (0-5) e do tipo de meio de cultura (MTC-1 a MTC-9).

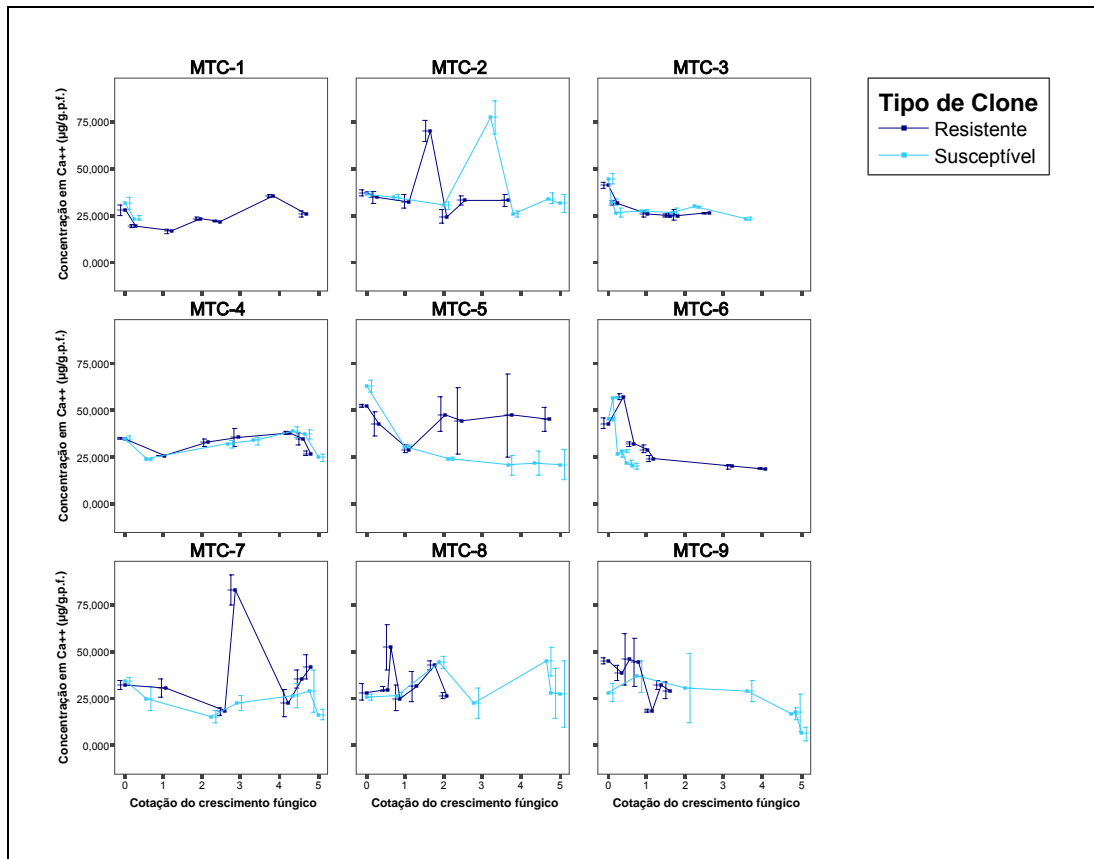


Fig. 5-9: Distribuição da concentração em Ca^{2+} ($\mu\text{g/g.p.f.}$) em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura. As barras de erro representam o valor da média somando e subtraindo do valor do desvio padrão ($\bar{x} \pm \text{DP}$).

Da análise da figura anterior é possível constatar que para o catião Ca^{2+} o padrão de distribuição do tecido resistente e susceptível aparentemente são muito díspares (com exceção dos meios MTC-3 e 4).

Para testar se as diferenças de distribuição dos valores de concentração em Ca^{2+} eram significativas foi aplicado o teste não-paramétrico para duas amostras emparelhadas de Wilcoxon apresentado na Tabela 5-12.

Tabela 5-12: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis concentração em Ca^{2+} ($\mu\text{g/g.p.f.}$) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

	Z	Sig. assintótica (bilateral)
MTC-1	-5,579	0,000***
MTC-2	-5,645	0,000***
MTC-3	-6,031	0,000***
MTC-4	-5,579	0,000***
MTC-5	-5,511	0,000***
MTC-6	-5,645	0,000***
MTC-7	-5,511	0,000***
MTC-8	-5,579	0,000***
MTC-9	-5,583	0,000***

Da análise da tabela anterior é possível verificar que, para a concentração em Ca^{2+} , em todos os meios de cultura as diferenças entre o tecido resistente e o susceptível são estatisticamente muito significativas ($p < 0,001$).

5.3.2.4. Concentração em Na^+

Na Tabela 5-13 apresenta-se a estatística descritiva da concentração Na^+ ($\mu\text{g/g.p.f.}$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Tabela 5-13: Estatística descritiva da concentração em Na^+ ($\mu\text{g/g.p.f.}$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Meio de Cultura		Tipo de Clone	
		Resistente	Susceptível
MTC-1	Média	68,004	66,010
	Desvio Padrão	17,837	7,504
MTC-2	Média	74,307	75,396
	Desvio Padrão	10,740	15,304
MTC-3	Média	82,018	77,351
	Desvio Padrão	9,949	12,024
MTC-4	Média	82,283	78,352
	Desvio Padrão	31,479	34,521
MTC-5	Média	68,926	68,990
	Desvio Padrão	23,007	21,791
MTC-6	Média	80,930	77,425
	Desvio Padrão	17,712	17,495
MTC-7	Média	72,124	69,668
	Desvio Padrão	32,279	26,085
MTC-8	Média	74,883	74,104
	Desvio Padrão	16,094	18,357
MTC-9	Média	73,698	72,376
	Desvio Padrão	25,530	23,690

Da análise da tabela anterior é possível constatar que para o catião Na^+ os valores médios para os tecido resistente variavam de um mínimo de 68,004 (MTC-1) a um máximo de 82,283

$\mu\text{g/g.p.f.}$ (MTC-4), enquanto que para o tecido susceptível variavam de um mínimo de 66,010 (MTC-1) a um máximo de 78,352 $\mu\text{g/g.p.f.}$ (MTC-4).

Em termos médios a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente de concentração em Na^+ no tecido caloso resistente infectado era:

MTC-4 > MTC-3 > MTC-6 > MTC-8 > MTC-2 > MTC-9 > MTC-7 > MTC-5 > MTC-1

No que respeita ao tecido caloso susceptível infectado a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente de concentração em Na^+ era:

MTC-4 > MTC-6 > MTC-3 > MTC-2 > MTC-8 > MTC-9 > MTC-7 > MTC-5 > MTC-1

Na Fig. 5-10 estão representados nove gráficos (que correspondem a 9 combinações de fitorreguladores) de 378 valores obtidos para a concentração em Na^+ ($\mu\text{g/g.p.f.}$). Estes valores estão graficados em função da cotação do crescimento fúngico (0-5) e do tipo de meio de cultura (MTC-1 a MTC-9).

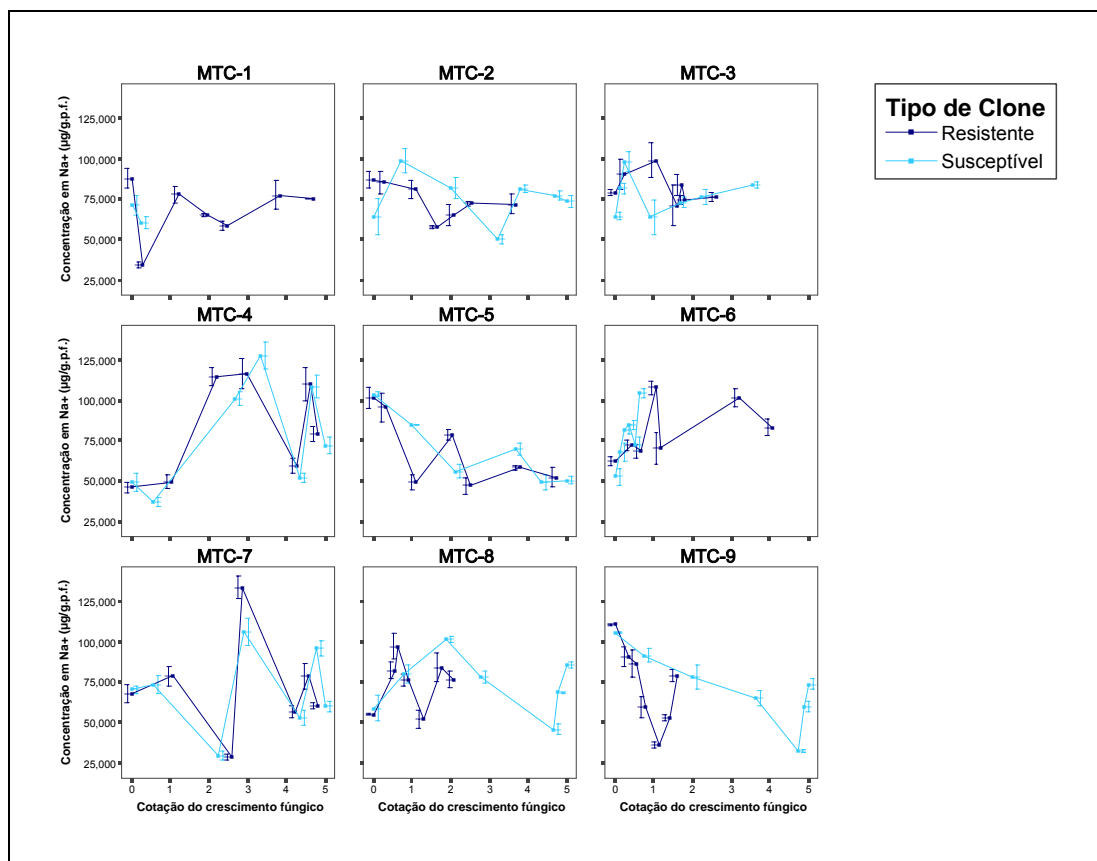


Fig. 5-10: Distribuição da concentração em Na^+ ($\mu\text{g/g.p.f.}$) em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura. As barras de erro representam o valor da média somando e subtraindo do valor do desvio padrão ($\chi \pm \text{DP}$).

Da análise da figura anterior é possível constatar que para o catião Na^+ existe em quantidades relativamente elevadas no tecido caloso e que não parecem existir diferenças

aparentes entre o tecido resistente e susceptível, isto é, em cada meio há um aparente sincronismo no padrão de distribuição da concentração deste catião entre os dois tipos de tecido (sobretudo nos meios MTC-2, 3, 4 e 7).

Para testar se as diferenças de distribuição dos valores de concentração em Na^+ eram significativas foi aplicado o teste não-paramétrico para duas amostras emparelhadas de Wilcoxon apresentado na Tabela 5-14.

Tabela 5-14: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis concentração em Na^+ ($\mu\text{g/g.p.f.}$) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

	Z	Sig. assintótica (bilateral)
MTC-1	-5,579	0,000***
MTC-2	-5,645	0,000***
MTC-3	-6,031	0,000***
MTC-4	-5,579	0,000***
MTC-5	-5,511	0,000***
MTC-6	-5,645	0,000***
MTC-7	-5,511	0,000***
MTC-8	-5,579	0,000***
MTC-9	-5,645	0,000***

Da análise da tabela anterior é possível verificar que, para a concentração em Na^+ , em todos os meios de cultura as diferenças entre o tecido resistente e o susceptível são estatisticamente muito significativas ($p < 0,001$).

5.3.2.5. Concentração em Mg^{2+}

Na Tabela 5-15 apresenta-se a estatística descritiva da concentração Mg^{2+} ($\mu\text{g/g.p.f.}$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Tabela 5-15: Estatística descritiva da concentração em Mg^{2+} ($\mu g/g.p.f.$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Meio de Cultura		Tipo de Clone	
		Resistente	Susceptível
MTC-1	Média	29,504	38,006
	Desvio Padrão	16,740	18,899
MTC-2	Média	23,355	22,417
	Desvio Padrão	4,358	2,676
MTC-3	Média	26,190	22,496
	Desvio Padrão	3,097	9,822
MTC-4	Média	28,016	21,710
	Desvio Padrão	11,230	4,121
MTC-5	Média	38,690	37,465
	Desvio Padrão	23,270	21,759
MTC-6	Média	23,008	24,708
	Desvio Padrão	3,363	4,223
MTC-7	Média	24,771	24,151
	Desvio Padrão	3,024	2,723
MTC-8	Média	25,965	26,138
	Desvio Padrão	2,497	2,524
MTC-9	Média	33,696	34,145
	Desvio Padrão	10,499	12,952

Da análise da tabela anterior é possível constatar que para o catião Mg^{2+} os valores médios para os tecido resistente variavam de um mínimo de 23,008 (MTC-6) a um máximo de 38,690 $\mu g/g.p.f.$ (MTC-5), enquanto que para o tecido susceptível variavam de um mínimo de 21,710 (MTC-4) a um máximo de 38,006 $\mu g/g.p.f.$ (MTC-1).

Em termos médios a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente de concentração em Mg^{2+} no tecido caloso resistente infectado era:

MTC-5 > MTC-9 > MTC-1 > MTC-4 > MTC-3 > MTC-8 > MTC-7 > MTC-2 > MTC-6

No que respeita ao tecido caloso susceptível infectado a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente de concentração em Mg^{2+} era:

MTC-1 > MTC-5 > MTC-9 > MTC-8 > MTC-6 > MTC-7 > MTC-3 > MTC-2 > MTC-4

Na Fig. 5-11 estão representados nove gráficos (que correspondem a 9 combinações de fitorreguladores) de 378 valores obtidos para a concentração em Mg^{2+} ($\mu g/g.p.f.$). Estes valores estão graficados em função da cotação do crescimento fúngico (0-5) e do tipo de meio de cultura (MTC-1 a MTC-9).

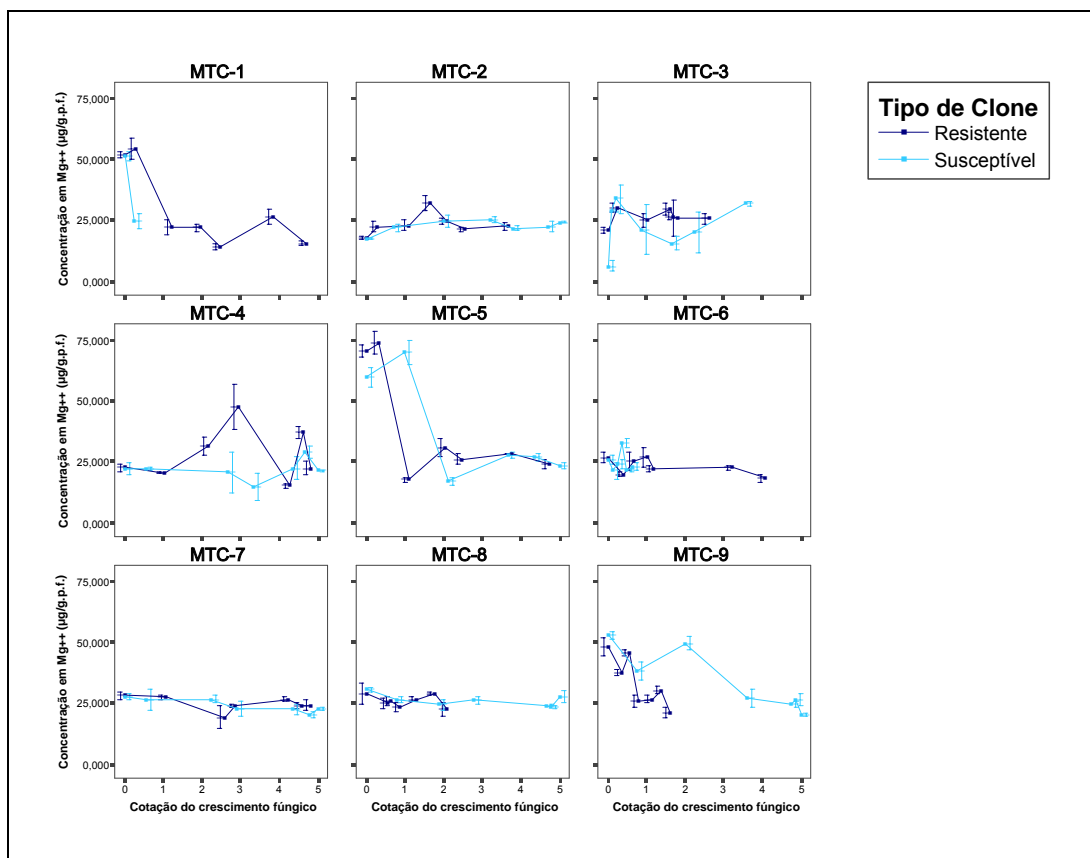


Fig. 5-11: Distribuição da concentração em Mg^{2+} ($\mu g/g.p.f.$) em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura. As barras de erro representam o valor da média somando e subtraindo do valor do desvio padrão ($\chi \pm DP$).

Da análise da figura anterior é possível constatar que para o catião Mg^{2+} existe em quantidades relativamente elevadas no tecido caloso e que não parecem existir diferenças aparentes entre o tecido resistente e susceptível, isto é, em cada meio há um aparente sincronismo no padrão de distribuição da concentração deste catião entre os dois tipos de tecido (sobretudo nos meios MTC-2, 5, 7 e 8).

Para testar se as diferenças de distribuição dos valores de concentração em Mg^{2+} eram significativas foi aplicado o teste não-paramétrico para duas amostras emparelhadas de Wilcoxon apresentado na Tabela 5-16.

Tabela 5-16: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis concentração em Mg^{2+} ($\mu g/g.p.f.$) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

	Z	Sig. assintótica (bilateral)
MTC-1	-5,579	0,000***
MTC-2	-5,645	0,000***
MTC-3	-6,031	0,000***
MTC-4	-5,579	0,000***
MTC-5	-5,511	0,000***
MTC-6	-5,645	0,000***
MTC-7	-5,511	0,000***
MTC-8	-5,579	0,000***
MTC-9	-5,645	0,000***

Da análise da tabela anterior é possível verificar que, para a concentração em Mg^{2+} , em todos os meios de cultura as diferenças entre o tecido resistente e o susceptível são estatisticamente muito significativas ($p < 0,001$).

5.3.2.6. Concentração em Cl^-

Na Tabela 5-17 apresenta-se a Estatística descritiva da concentração em Cl^- ($\mu g/g.p.f.$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Tabela 5-17: Estatística descritiva da concentração em Cl^- ($\mu g/g.p.f.$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Meio de Cultura		Tipo de Clone	
		Resistente	Susceptível
MTC-1	Média	84,231	168,992
	Desvio Padrão	17,173	4,404
MTC-2	Média	87,687	173,113
	Desvio Padrão	17,684	2,667
MTC-3	Média	87,573	176,843
	Desvio Padrão	20,084	3,803
MTC-4	Média	94,291	175,919
	Desvio Padrão	20,502	5,716
MTC-5	Média	90,543	173,657
	Desvio Padrão	18,135	3,376
MTC-6	Média	84,928	172,517
	Desvio Padrão	18,967	2,627
MTC-7	Média	82,256	171,297
	Desvio Padrão	19,247	5,057
MTC-8	Média	83,307	174,640
	Desvio Padrão	19,095	3,696
MTC-9	Média	84,686	173,125
	Desvio Padrão	15,210	3,307

Da análise da tabela anterior é possível constatar que para o anião Cl^- os valores médios para os tecido resistente variavam de um mínimo de 82,256 (MTC-7) a um máximo de 94,291

$\mu\text{g/g.p.f.}$ (MTC-5), enquanto que para o tecido susceptível variavam de um mínimo de 168,992 (MTC-1) a um máximo de 176,843 $\mu\text{g/g.p.f.}$ (MTC-3).

Em termos médios a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente de concentração em Cl^- no tecido caloso resistente infectado era:

$$\text{MTC-4} > \text{MTC-5} > \text{MTC-2} > \text{MTC-3} > \text{MTC-6} > \text{MTC-9} > \text{MTC-1} > \text{MTC-8} > \text{MTC-7}$$

No que respeita ao tecido caloso susceptível infectado a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente de concentração em Cl^- era:

$$\text{MTC-3} > \text{MTC-4} > \text{MTC-8} > \text{MTC-5} > \text{MTC-9} > \text{MTC-2} > \text{MTC-6} > \text{MTC-7} > \text{MTC-1}$$

Na Fig. 5-12 estão representados nove gráficos (que correspondem a 9 combinações de fitorreguladores) de 390 valores obtidos para a concentração em Cl^- ($\mu\text{g/g.p.f.}$) Estes valores estão graficados em função da cotação do crescimento fúngico (0-5) e do tipo de meio de cultura (MTC-1 a MTC-9).

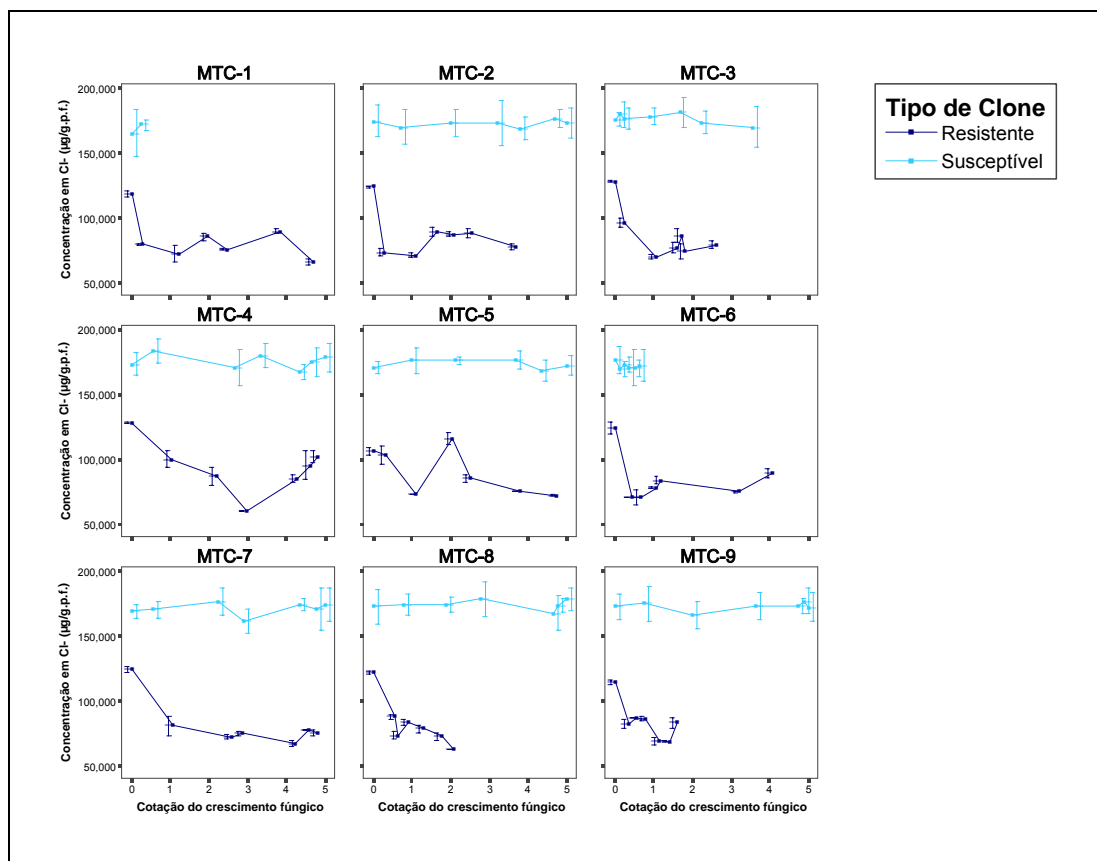


Fig. 5-12: Distribuição da concentração em Cl^- ($\mu\text{g/g.p.f.}$) em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura. As barras de erro representam o valor da média somando e subtraindo do valor do desvio padrão ($\chi \pm \text{DP}$).

Da análise da figura anterior é possível constatar que para o anião Cl^- a concentração é sempre superior para o tecido susceptível (rácio de 1,9 a 2,1, a concentração é aproximadamente

o dobro). Para este tecido a concentração não aparenta variar com a cotação do crescimento fúngico. A concentração deste anião varia mais para o tecido resistente, independentemente do grau de CCF.

Para testar se as diferenças de distribuição dos valores de concentração em Cl^- eram significativas foi aplicado o teste não-paramétrico para duas amostras emparelhadas de Wilcoxon apresentado na Tabela 5-18.

Tabela 5-18: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis concentração em Cl^- ($\mu\text{g/g.p.f.}$) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

	Z	Sig. assintótica (bilateral)
MTC-1	-5,579	0,000***
MTC-2	-5,645	0,000***
MTC-3	-5,841	0,000***
MTC-4	-5,841	0,000***
MTC-5	-5,841	0,000***
MTC-6	-5,645	0,000***
MTC-7	-5,645	0,000***
MTC-8	-5,841	0,000***
MTC-9	-5,645	0,000***

Da análise da tabela anterior é possível verificar que, para a concentração em Mg^{2+} , em todos os meios de cultura as diferenças entre o tecido resistente e o susceptível são estatisticamente muito significativas ($p < 0,001$).

5.3.2.7. Concentração em NO_2^-

Na Tabela 5-19 apresenta-se a Estatística descritiva da concentração em NO_2^- ($\mu\text{g/g.p.f.}$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Tabela 5-19: Estatística descritiva da concentração em NO_2^- ($\mu\text{g/g.p.f.}$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Meio de Cultura		Tipo de Clone	
		Resistente	Susceptível
MTC-1	Média	0,255	0,255
	Desvio Padrão	0,000	0,000
MTC-2	Média	3,281	7,793
	Desvio Padrão	8,006	19,943
MTC-3	Média	0,255	0,255
	Desvio Padrão	0,000	0,000
MTC-4	Média	26,158	0,255
	Desvio Padrão	47,518	0,000
MTC-5	Média	2,687	0,255
	Desvio Padrão	6,435	0,000
MTC-6	Média	0,255	0,255
	Desvio Padrão	0,000	0,000
MTC-7	Média	0,255	6,166
	Desvio Padrão	0,000	15,640
MTC-8	Média	20,633	26,138
	Desvio Padrão	53,916	44,274
MTC-9	Média	7,385	1,737
	Desvio Padrão	18,864	3,922

Da análise da tabela anterior é possível constatar que para o anião NO_2^- os valores médios para os tecido resistente variavam de um mínimo de 0,255 (MTC-7) a um máximo de 26,158 $\mu\text{g/g.p.f.}$ (MTC-4), enquanto que para o tecido susceptível variavam de um mínimo de 0,255 (MTC-6) a um máximo de 26,138 $\mu\text{g/g.p.f.}$ (MTC-8).

Em termos médios a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente de concentração em Cl^- no tecido caloso resistente infectado era:

MTC-4 > MTC-8 > MTC-9 > MTC-2 > MTC-5 > MTC-1 > MTC-3 > MTC-6 > MTC-7

No que respeita ao tecido caloso susceptível infectado a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente de concentração em NO_2^- era:

MTC-8 > MTC-2 > MTC-7 > MTC-9 > MTC-1 > MTC-4 > MTC-5 > MTC-3 > MTC-6

Na Fig. 5-13 estão representados nove gráficos (que correspondem a 9 combinações de fitorreguladores) de 390 valores obtidos para a concentração em NO_2^- ($\mu\text{g/g.p.f.}$) Estes valores estão graficados em função da cotação do crescimento fúngico (0-5) e do tipo de meio de cultura (MTC-1 a MTC-9).

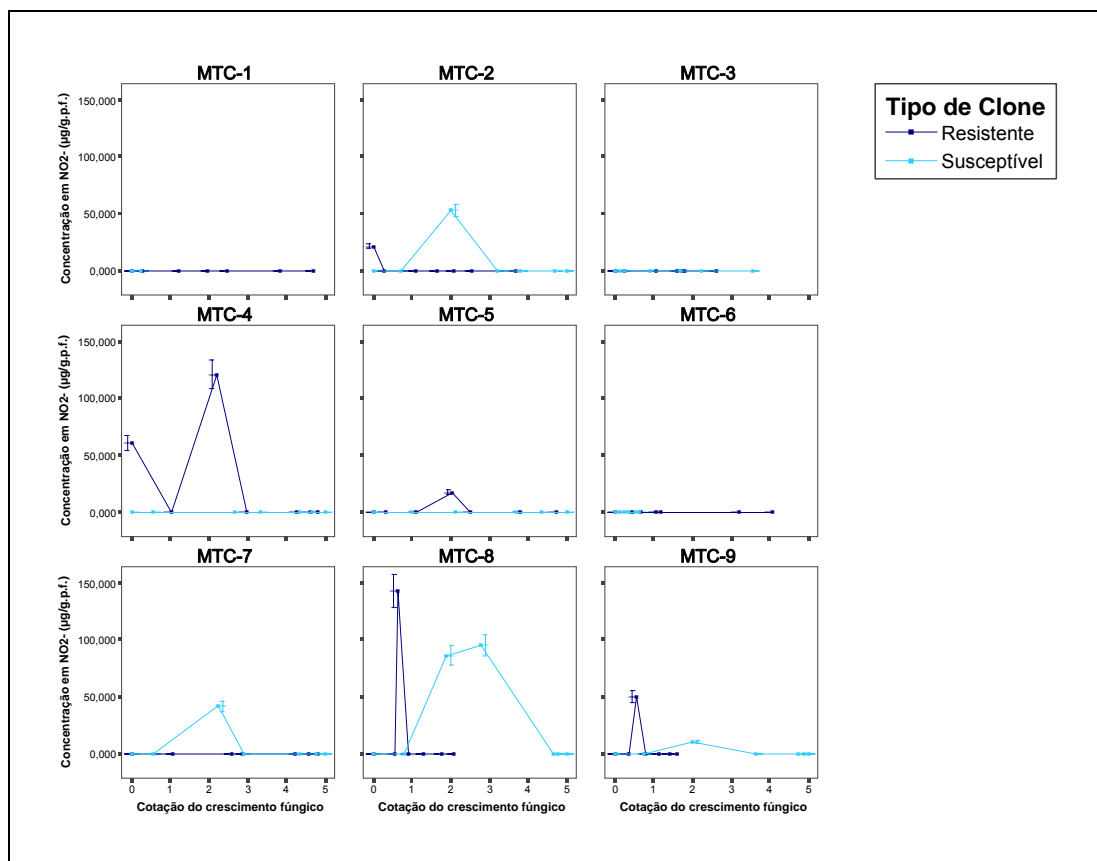


Fig. 5-13: Distribuição da concentração em NO_2^- ($\mu\text{g/g.p.f.}$) em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura. As barras de erro representam o valor da média somando e subtraindo do valor do desvio padrão ($\bar{x} \pm \text{DP}$).

Da análise da figura anterior é possível constatar que para o catião NO_2^- existe em quantidades nulas ou vestigiais no tecido caloso resistente e susceptível infectados.

Para testar se as diferenças de distribuição dos valores de concentração em NO_2^- eram significativas foi aplicado o teste não-paramétrico para duas amostras emparelhadas de Wilcoxon apresentado na Tabela 5-20.

Tabela 5-20: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis concentração em NO_2^- ($\mu\text{g/g.p.f.}$) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

	Z	Sig. assintótica (bilateral)
MTC-1	-1,785	0,074 ^{NS}
MTC-2	-2,496	0,013 ^{**}
MTC-3	-4,491	0,000 ^{***}
MTC-4	-2,728	0,006 ^{**}
MTC-5	-3,544	0,000 ^{***}
MTC-6	-3,661	0,000 ^{***}
MTC-7	-3,848	0,000 ^{***}
MTC-8	-1,440	0,150 ^{NS}
MTC-9	-2,196	0,028 [*]

Da análise da tabela anterior é possível verificar que, apesar das diferenças anteriormente assinaladas na Tabela 5-19 e Fig. 5-13, em sete meios de cultura as diferenças entre o tecido resistente e o susceptível são estatisticamente significativas, designadamente: MTC-3, MTC-5, MTC-6 e MTC-7 ($p < 0,001$); MTC-2 e MTC-4 ($p < 0,01$); MTC-9 ($p < 0,05$).

5.3.2.8. Concentração em SO_4^{2-}

Na Tabela 5-21 apresenta-se a Estatística descritiva da concentração em SO_4^{2-} ($\mu\text{g/g.p.f.}$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Tabela 5-21: Estatística descritiva da concentração em SO_4^{2-} ($\mu\text{g/g.p.f.}$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Meio de Cultura		Tipo de Clone	
		Resistente	Susceptível
MTC-1	Média	153,585	229,698
	Desvio Padrão	61,989	6,983
MTC-2	Média	146,153	219,919
	Desvio Padrão	54,780	3,811
MTC-3	Média	148,170	211,740
	Desvio Padrão	45,691	17,069
MTC-4	Média	139,625	227,416
	Desvio Padrão	65,036	16,509
MTC-5	Média	142,578	228,542
	Desvio Padrão	52,456	12,067
MTC-6	Média	135,843	216,614
	Desvio Padrão	48,304	19,168
MTC-7	Média	140,979	232,532
	Desvio Padrão	52,340	11,441
MTC-8	Média	145,405	222,818
	Desvio Padrão	58,540	21,789
MTC-9	Média	139,677	224,138
	Desvio Padrão	50,000	15,969

Da análise da tabela anterior é possível constatar que para o anião SO_4^{2-} os valores médios para os tecido resistente variavam de um mínimo de 135,843 (MTC-6) a um máximo de 153,585 $\mu\text{g/g.p.f.}$ (MTC-1), enquanto que para o tecido susceptível variavam de um mínimo de 211,740 (MTC-3) a um máximo de 232,532 $\mu\text{g/g.p.f.}$ (MTC-7).

Em termos médios a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente de concentração em SO_4^{2-} no tecido caloso resistente infectado era:

MTC-1 > MTC-3 > MTC-2 > MTC-8 > MTC-5 > MTC-7 > MTC-9 > MTC-4 > MTC-6

No que respeita ao tecido caloso susceptível infectado a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente de concentração em SO_4^{2-} era:

MTC-7 > MTC-1 > MTC-5 > MTC-4 > MTC-9 > MTC-8 > MTC-2 > MTC-6 > MTC-3

Na Fig. 5-14 estão representados nove gráficos (que correspondem a 9 combinações de fitorreguladores) de 390 valores obtidos para a concentração em SO_4^{2-} ($\mu\text{g/g.p.f.}$). Estes valores estão graficados em função da cotação do crescimento fúngico (0-5) e do tipo de meio de cultura (MTC-1 a MTC-9).

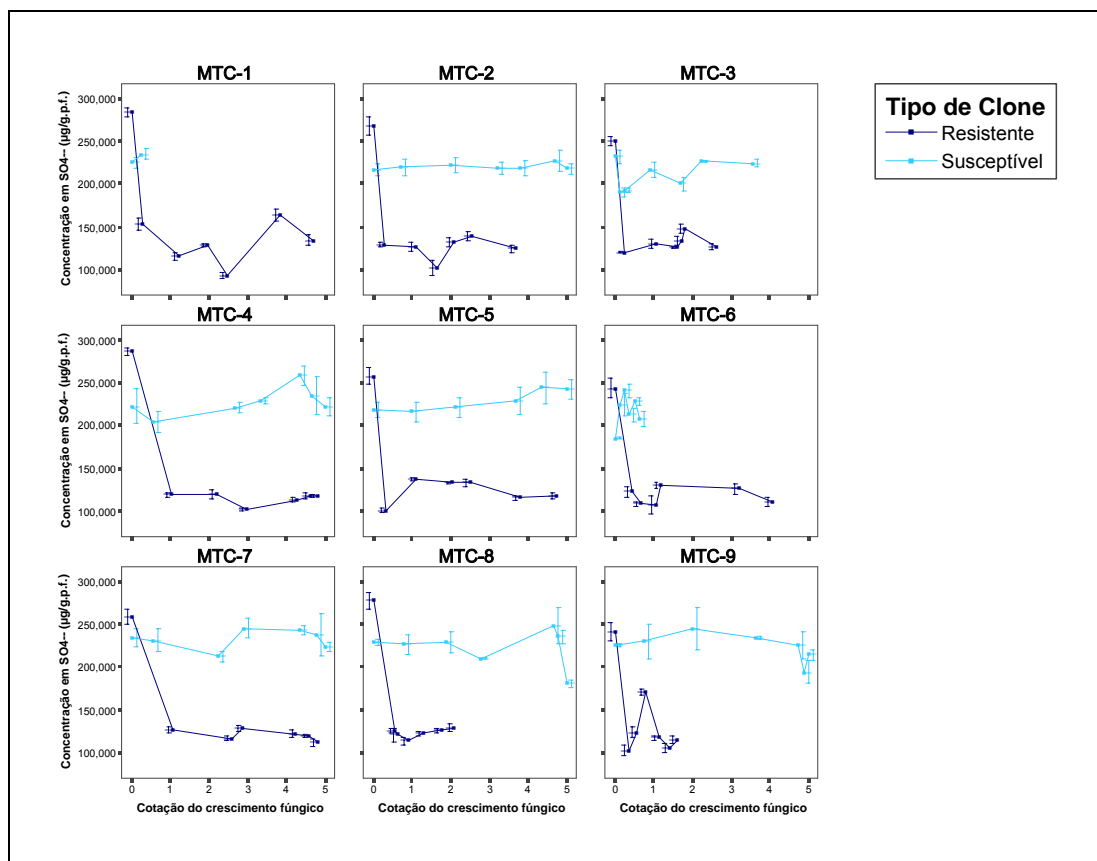


Fig. 5-14: Distribuição da concentração em SO_4^{2-} ($\mu\text{g/g.p.f.}$) em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura. As barras de erro representam o valor da média somando e subtraindo do valor do desvio padrão ($\bar{x} \pm \text{DP}$).

Da análise da figura anterior é possível constatar que para o ânion SO_4^{2-} , e um pouco à semelhança do que acontece com o Cl^- , a concentração é quase sempre superior para o tecido susceptível, a exceção reporta-se ao primeiro dia de interação. Também para este ânion a proporção entre a concentração dos dois tipos de tecido é assinalável (rácio de 1,4 a 1,6, a concentração do tecido susceptível é aproximadamente 1,5x maior que a do tecido resistente). Para este tecido a concentração não aparenta variar com a cotação do crescimento fúngico.

Para testar se as diferenças de distribuição dos valores de concentração em SO_4^{2-} eram significativas foi aplicado o teste não-paramétrico para duas amostras emparelhadas de Wilcoxon apresentado na Tabela 5-22.

Tabela 5-22: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis concentração em SO_4^{2-} ($\mu\text{g/g.p.f.}$) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

	Z	Sig. assintótica. (bilateral)
MTC-1	-5,579	0,000***
MTC-2	-5,645	0,000***
MTC-3	-5,841	0,000***
MTC-4	-5,841	0,000***
MTC-5	-5,841	0,000***
MTC-6	-5,645	0,000***
MTC-7	-5,645	0,000***
MTC-8	-5,841	0,000***
MTC-9	-5,645	0,000***

Da análise da tabela anterior é possível verificar que, para a concentração em SO_4^{2-} , em todos os meios de cultura as diferenças entre o tecido resistente e o susceptível são estatisticamente muito significativas ($p < 0,001$).

5.3.2.9. Concentração em NO_3^-

Na Tabela 5-23 apresenta-se a Estatística descritiva da concentração em NO_3^- ($\mu\text{g/g.p.f.}$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Tabela 5-23: Estatística descritiva da concentração em NO_3^- ($\mu\text{g/g.p.f.}$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Meio de Cultura		Tipo de Clone	
		Resistente	Susceptível
MTC-1	Média	1,960	0,293
	Desvio Padrão	4,409	0,000
MTC-2	Média	22,048	24,615
	Desvio Padrão	40,430	53,170
MTC-3	Média	0,293	0,293
	Desvio Padrão	0,000	0,000
MTC-4	Média	17,122	15,652
	Desvio Padrão	44,526	40,019
MTC-5	Média	8,259	32,500
	Desvio Padrão	21,076	75,154
MTC-6	Média	0,293	2,150
	Desvio Padrão	0,000	3,092
MTC-7	Média	1,973	2,662
	Desvio Padrão	3,406	6,266
MTC-8	Média	1,618	11,179
	Desvio Padrão	3,506	19,292
MTC-9	Média	1,212	7,078
	Desvio Padrão	2,432	14,144

Da análise da tabela anterior é possível constatar que para o anião NO_3^- os valores médios

para os tecido resistente variavam de um mínimo de 0,293 (MTC-6) a um máximo de 22,048 $\mu\text{g/g.p.f.}$ (MTC-2), enquanto que para o tecido susceptível variavam de um mínimo de 0,293 (MTC-1) a um máximo de 32,500 $\mu\text{g/g.p.f.}$ (MTC-3).

Em termos médios a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente de concentração em NO_3^- no tecido caloso resistente infectado era:

MTC-2 > MTC-4 > MTC-5 > MTC-7 > MTC-1 > MTC-8 > MTC-9 > MTC-3 > MTC-6

No que respeita ao tecido caloso susceptível infectado a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente de concentração em NO_3^- era:

MTC-3 > MTC-4 > MTC-8 > MTC-5 > MTC-9 > MTC-2 > MTC-6 > MTC-7 > MTC-1

Na Fig. 5-15 estão representados nove gráficos (que correspondem a 9 combinações de fitorreguladores) de 390 valores obtidos para a concentração em NO_3^- ($\mu\text{g/g.p.f.}$) Estes valores estão graficados em função da cotação do crescimento fúngico (0-5) e do tipo de meio de cultura (MTC-1 a MTC-9).

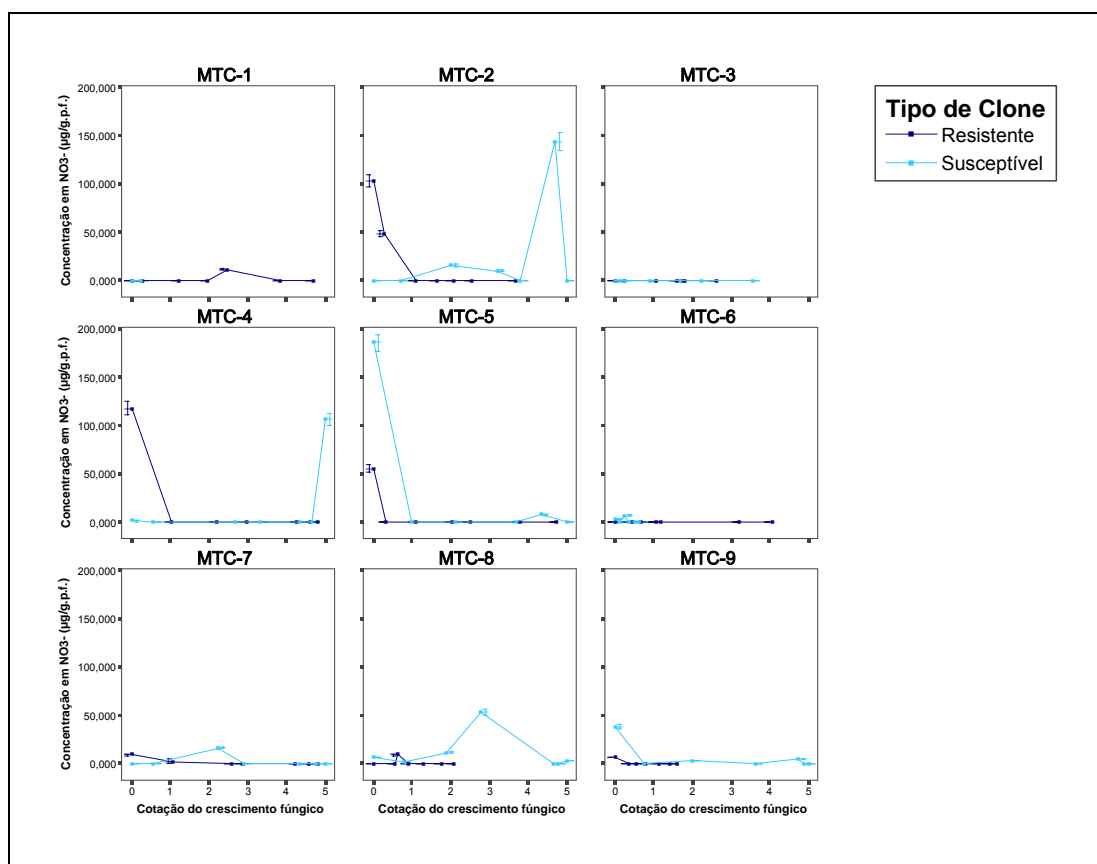


Fig. 5-15: Distribuição da concentração em NO_3^- ($\mu\text{g/g.p.f.}$) em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura. As barras de erro representam o valor da média somando e subtraindo do valor do desvio padrão ($\bar{x} \pm \text{DP}$).

Da análise da figura anterior é possível constatar que para o anião NO_3^- existe em

quantidades nulas ou vestigiais no tecido caloso resistente e susceptível infectados.

Para testar se as diferenças de distribuição dos valores de concentração em NO_3^- eram significativas foi aplicado o teste não-paramétrico para duas amostras emparelhadas de Wilcoxon apresentado na Tabela 5-24.

Tabela 5-24: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis concentração em NO_3^- ($\mu\text{g/g.p.f.}$) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

	Z	Sig. assintótica (bilateral)
MTC-1	-0,530	0,596 ^{NS}
MTC-2	-0,994	0,320 ^{NS}
MTC-3	-4,491	0,000***
MTC-4	-2,049	0,040*
MTC-5	-0,830	0,406 ^{NS}
MTC-6	-1,783	0,075 ^{NS}
MTC-7	-2,045	0,041*
MTC-8	-0,548	0,584 ^{NS}
MTC-9	-1,107	0,268 ^{NS}

Da análise da tabela anterior é possível verificar que, para a concentração em NO_3^- , em apenas três meios de cultura as diferenças entre o tecido resistente e o susceptível são estatisticamente significativas, designadamente: MTC-3 ($p < 0,001$); MTC-4 e MTC-7 ($p < 0,05$).

5.3.2.10. Concentração em Oxalato

Na Tabela 5-25 apresenta-se a Estatística descritiva da concentração em Oxalato ($\mu\text{g/g.p.f.}$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura. Da análise da tabela é possível constatar que para o anião Oxalato os valores médios para os tecido resistente variavam de um mínimo de 12,368 (MTC-8) a um máximo de 45,681 $\mu\text{g/g.p.f.}$ (MTC-7), enquanto que para o tecido susceptível variavam de um mínimo de 5,609 (MTC-7) a um máximo de 53,278 $\mu\text{g/g.p.f.}$ (MTC-1).

Em termos médios a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente de concentração em Oxalato no tecido caloso resistente infectado era:

MTC-7 > MTC-9 > MTC-5 > MTC-1 > MTC-4 > MTC-3 > MTC-2 > MTC-6 > MTC-8

No que respeita ao tecido caloso susceptível infectado a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente de concentração em Oxalato era:

MTC-1 > MTC-6 > MTC-8 > MTC-4 > MTC-9 > MTC-2 > MTC-5 > MTC-3 > MTC-7

Tabela 5-25: Estatística descritiva da concentração em Oxalato ($\mu\text{g/g.p.f.}$) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Meio de Cultura		Tipo de Clone	
		Resistente	Susceptível
MTC-1	Média	20,845	53,278
	Desvio Padrão	15,694	55,822
MTC-2	Média	16,796	16,701
	Desvio Padrão	19,811	17,738
MTC-3	Média	18,988	9,850
	Desvio Padrão	19,525	10,992
MTC-4	Média	20,344	23,497
	Desvio Padrão	22,148	19,246
MTC-5	Média	22,947	14,503
	Desvio Padrão	22,653	18,818
MTC-6	Média	16,387	35,382
	Desvio Padrão	14,093	61,821
MTC-7	Média	45,681	5,609
	Desvio Padrão	31,631	9,913
MTC-8	Média	12,368	26,925
	Desvio Padrão	11,205	23,411
MTC-9	Média	29,648	22,851
	Desvio Padrão	27,393	30,223

Na Fig. 5-16 estão representados nove gráficos (que correspondem a 9 combinações de fitorreguladores) de 390 valores obtidos para a concentração em Oxalato ($\mu\text{g/g.p.f.}$). Estes valores estão graficados em função da cotação do crescimento fúngico (0-5) e do tipo de meio de cultura (MTC-1 a MTC-9). Da análise da figura é possível constatar que para o anão Oxalato a concentração é superior para o tecido susceptível nos meios MTC-4, MTC-6, MTC-8 e MTC-1 (rácio de 1,2 a 2,6) e inferior nos meios MTC-7, MTC-3, MTC-5, MTC-9 e MTC-2. A concentração deste anão varia mais para o tecido susceptível do que para o tecido resistente. Da leitura da figura é difícil escrutinar se existe uma relação entre a CCF e a concentração em oxalato. Quando os tecidos calosos (susceptível e resistente) apresentam uma resposta de resistência verifica-se uma diminuição assinalável da concentração em oxalato no susceptível (MTC-1 e MTC-6) e apenas ligeira no resistente (MTC-3 e MTC-8).

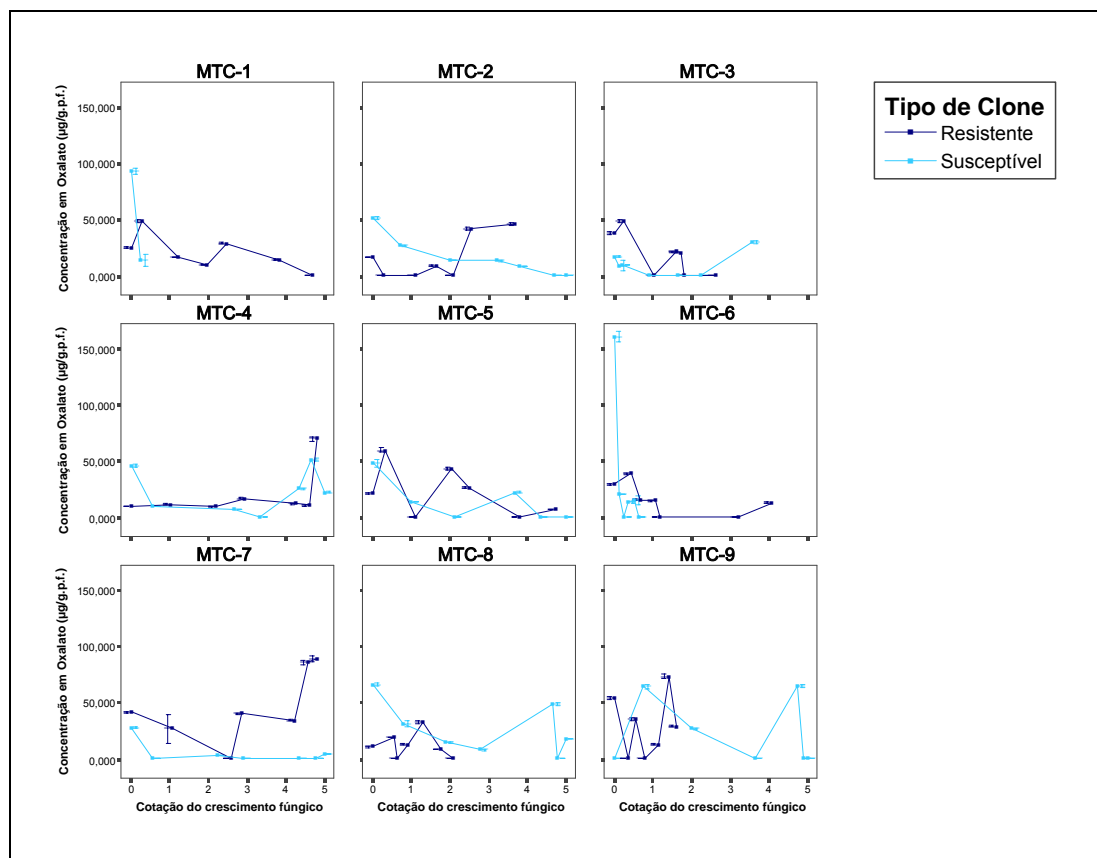


Fig. 5-16: Distribuição da concentração em Oxalato ($\mu\text{g/g.p.f.}$) em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura. As barras de erro representam o valor da média somando e subtraindo do valor do desvio padrão ($\chi \pm \text{DP}$).

Para testar se as diferenças de distribuição dos valores de concentração em Oxalato eram significativas foi aplicado o teste não-paramétrico para duas amostras emparelhadas de Wilcoxon apresentado na Tabela 5-26.

Tabela 5-26: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis concentração em Oxalato ($\mu\text{g/g.p.f.}$) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

	Z	Sig. assintótica (bilateral)
MTC-1	-5,085	0,000***
MTC-2	-4,333	0,000***
MTC-3	-3,066	0,002**
MTC-4	-5,774	0,000***
MTC-5	-3,506	0,000***
MTC-6	-5,046	0,000***
MTC-7	-2,970	0,003**
MTC-8	-5,402	0,000***
MTC-9	-4,071	0,000***

Da análise da tabela anterior é possível verificar que, para a concentração em Oxalato, em

todos os meios de cultura as diferenças entre o tecido resistente e o susceptível são estatisticamente significativas. Apenas nos meios MTC-3 e MTC-7 as diferenças eram estatisticamente significativas ($p < 0,01$), para os restantes meios eram muito significativas ($p < 0,001$).

5.3.2.11. Concentração em F⁻

Na Tabela 5-27 apresenta-se a estatística descritiva da concentração em F⁻ (µg/g.p.f.) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Da análise da Tabela 5-27 é possível constatar que para o anião F⁻ os valores médios para os tecido resistente variavam de um mínimo de 0,236 (MTC-8) a um máximo de 18,089 µg/g.p.f. (MTC-5), enquanto que para o tecido susceptível variavam de um mínimo de 0,236 (MTC-3) a um máximo de 14,394 µg/g.p.f. (MTC-5).

Em termos médios a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente de concentração em F⁻ no tecido caloso resistente infectado era:

MTC-5 > MTC-9 > MTC-2 > MTC-4 > MTC-3 > MTC-6 > MTC-7 > MTC-1 > MTC-8

Tabela 5-27: Estatística descritiva da concentração em F⁻ (µg/g.p.f.) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Meio de Cultura		Tipo de Clone	
		Resistente	Susceptível
MTC-1	Média	0,661	3,312
	Desvio Padrão	1,124	4,047
MTC-2	Média	2,093	2,930
	Desvio Padrão	3,387	4,791
MTC-3	Média	1,443	0,236
	Desvio Padrão	3,192	0,000
MTC-4	Média	1,919	1,125
	Desvio Padrão	2,210	1,557
MTC-5	Média	18,089	14,394
	Desvio Padrão	42,657	27,978
MTC-6	Média	1,206	1,062
	Desvio Padrão	1,927	1,450
MTC-7	Média	1,145	0,752
	Desvio Padrão	1,951	1,364
MTC-8	Média	0,236	3,451
	Desvio Padrão	0,000	4,513
MTC-9	Média	2,511	1,781
	Desvio Padrão	3,956	2,244

No que respeita ao tecido caloso susceptível infectado a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente de concentração em F⁻ era:

MTC-5 > MTC-8 > MTC-1 > MTC-2 > MTC-9 > MTC-4 > MTC-6 > MTC-7 > MTC-3

Na Fig. 5-17 estão representados nove gráficos (que correspondem a 9 combinações de fitorreguladores) de 390 valores obtidos para a concentração em F^- ($\mu\text{g/g.p.f.}$) Estes valores estão graficados em função da cotação do crescimento fúngico (0-5) e do tipo de meio de cultura (MTC-1 a MTC-9).

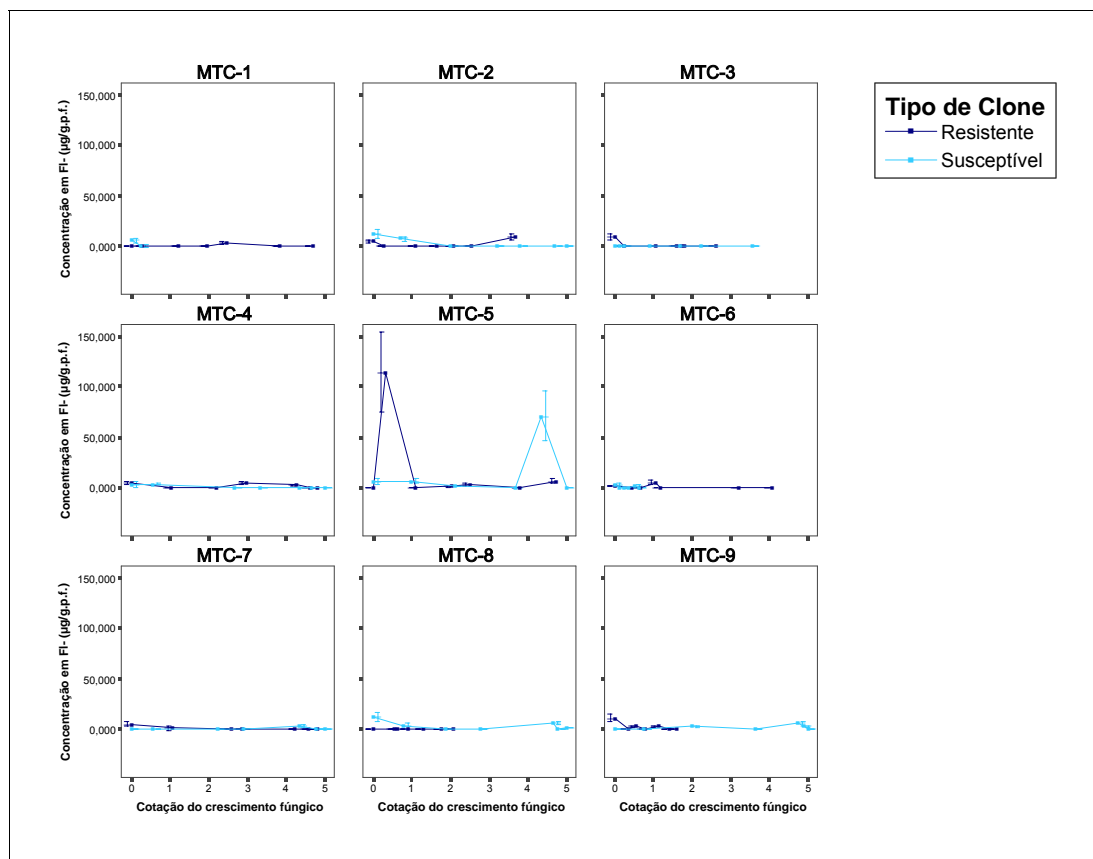


Fig. 5-17: Distribuição da concentração em F^- ($\mu\text{g/g.p.f.}$) em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura. As barras de erro representam o valor da média somando e subtraindo do valor do desvio padrão ($\bar{x} \pm DP$).

Da análise da figura anterior é possível constatar que para o anião F^- a concentração é sempre superior para o tecido susceptível (rácio de 1,9 a 2,1, a concentração é aproximadamente o dobro). Para este tecido a concentração não aparenta variar com a cotação do crescimento fúngico. A concentração deste anião varia mais para o tecido resistente, independentemente do grau de CCF.

Para testar se as diferenças de distribuição dos valores de concentração em F^- eram significativas foi aplicado o teste não-paramétrico para duas amostras emparelhadas de Wilcoxon apresentado na Tabela 5-28.

Tabela 5-28: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis concentração em F⁻ (µg/g.p.f.) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

	Z	Sig. assintótica (bilateral)
MTC-1	-2,095	0,036*
MTC-2	-0,582	0,561 ^{NS}
MTC-3	-3,541	0,000***
MTC-4	-2,061	0,039*
MTC-5	-1,146	0,252 ^{NS}
MTC-6	-0,582	0,561 ^{NS}
MTC-7	-3,897	0,000***
MTC-8	-2,298	0,022*
MTC-9	-0,644	0,519 ^{NS}

Da análise da tabela anterior é possível verificar que, para a concentração em F⁻, em apenas cinco meios de cultura as diferenças entre o tecido resistente e o susceptível são estatisticamente significativas, designadamente: MTC-3 e MTC-7 ($p < 0,001$); MTC-1, MTC-4 e MTC-8 ($p < 0,05$).

5.3.2.12. Concentração em HPO_4^{2-}

Na Tabela 5-29 apresenta-se a Estatística descritiva da concentração em HPO_4^{2-} (µg/g.p.f.) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Tabela 5-29: Estatística descritiva da concentração em HPO_4^{2-} (µg/g.p.f.) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Meio de Cultura		Tipo de Clone	
		Resistente	Susceptível
MTC-1	Média	184,556	304,555
	Desvio Padrão	41,447	131,209
MTC-2	Média	198,869	374,982
	Desvio Padrão	44,868	108,024
MTC-3	Média	187,557	391,892
	Desvio Padrão	44,243	108,615
MTC-4	Média	196,085	359,115
	Desvio Padrão	27,317	61,406
MTC-5	Média	173,680	395,468
	Desvio Padrão	13,518	80,374
MTC-6	Média	183,408	381,155
	Desvio Padrão	25,588	94,852
MTC-7	Média	163,587	420,372
	Desvio Padrão	11,379	95,491
MTC-8	Média	163,521	392,473
	Desvio Padrão	15,680	91,673
MTC-9	Média	192,064	361,950
	Desvio Padrão	32,673	96,910

Da análise da tabela anterior é possível constatar que para o anião HPO_4^{2-} os valores médios para os tecido resistente variavam de um mínimo de 163,521 (MTC-8) a um máximo de 198,869 $\mu\text{g/g.p.f.}$ (MTC-2), enquanto que para o tecido susceptível variavam de um mínimo de 304,555 (MTC-1) a um máximo de 420,372 $\mu\text{g/g.p.f.}$ (MTC-7).

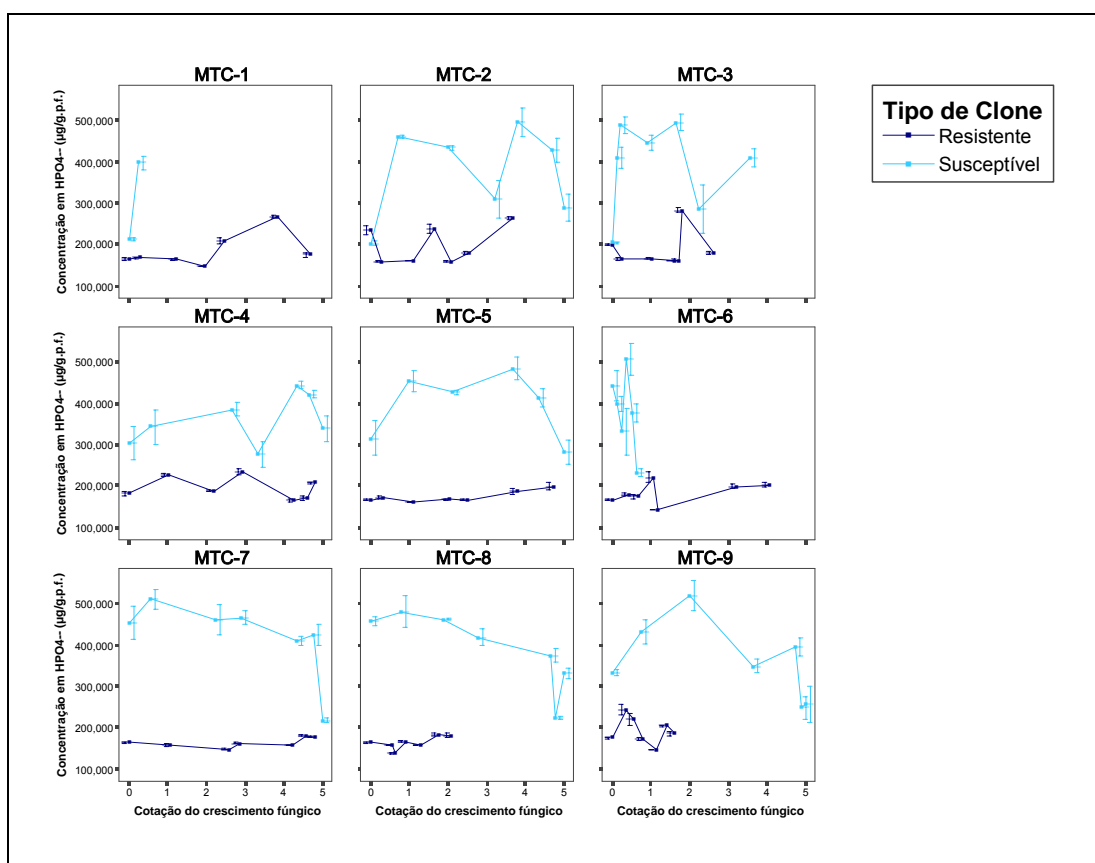
Em termos médios a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente de concentração em HPO_4^{2-} no tecido caloso resistente infectado era:

$$\text{MTC-2} > \text{MTC-4} > \text{MTC-9} > \text{MTC-3} > \text{MTC-1} > \text{MTC-6} > \text{MTC-5} > \text{MTC-7} > \text{MTC-8}$$

No que respeita ao tecido caloso susceptível infectado a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente de concentração em HPO_4^{2-} era:

$$\text{MTC-7} > \text{MTC-5} > \text{MTC-8} > \text{MTC-3} > \text{MTC-6} > \text{MTC-2} > \text{MTC-9} > \text{MTC-4} > \text{MTC-1}$$

Na Fig. 5-18 estão representados nove gráficos (que correspondem a 9 combinações de fitorreguladores) de 390 valores obtidos para a concentração em HPO_4^{2-} ($\mu\text{g/g.p.f.}$) Estes valores estão graficados em função da cotação do crescimento fúngico (0-5) e do tipo de meio de cultura (MTC-1 a MTC-9).



Da análise da figura anterior é possível constatar que para o anião HPO_4^{2-} a concentração é sempre superior para o tecido susceptível (rácio de 1,7 a 2,6).

Para testar se as diferenças de distribuição dos valores de concentração em HPO_4^{2-} eram significativas foi aplicado o teste não-paramétrico para duas amostras emparelhadas de Wilcoxon apresentado na Tabela 5-30.

Tabela 5-30: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis concentração em HPO_4^{2-} ($\mu\text{g/g.p.f.}$) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

	Z	Sig. assimpótica (bilateral)
MTC-1	-5,579	0,000***
MTC-2	-5,645	0,000***
MTC-3	-5,841	0,000***
MTC-4	-5,841	0,000***
MTC-5	-5,841	0,000***
MTC-6	-5,645	0,000***
MTC-7	-5,645	0,000***
MTC-8	-5,841	0,000***
MTC-9	-5,645	0,000***

Da análise da tabela anterior é possível verificar que, para a concentração em HPO_4^{2-} , em todos os meios de cultura as diferenças entre o tecido resistente e o susceptível são estatisticamente muito significativas ($p < 0,001$).

5.3.2.13. Correlações canónicas entre as concentrações dos iões e as variáveis independentes

Uma correlação canónica é a correlação de duas variáveis (latentes) canónicas, uma que representa um conjunto de variáveis independentes, a outra um conjunto de variáveis dependentes. Cada conjunto pode ser considerado uma variável latente baseada em variáveis medidas do indicador no seu conjunto. A correlação canónica optimizada de forma que a correlação linear entre as duas variáveis latentes é maximizada. Visto que a regressão múltipla é usada nas relações muitos-para-um, a correlação canónica é usada para relações muitos-para-muitos. Pode haver mais do que uma correlação linear entre dois conjuntos de variáveis, sendo que cada correlação representa uma dimensão diferente do conjunto das variáveis independentes quando relacionadas com as variáveis dependentes. A finalidade da correlação canónica é explicar a relação dos dois conjuntos das variáveis, para não modelar as variáveis individuais. Para cada variável canónica podemos também avaliar quão fortemente se relacionam as variáveis medidas no seu próprio conjunto, ou no conjunto da outra variável canónica. O lambda de Wilks é usado geralmente para testar o significado da correlação canónica.

Analogamente com correlação ordinária, o quadrado da correlação canônica traduz a percentagem da variação no conjunto dependente explicado pelo conjunto independente das variáveis ao longo de uma determinada dimensão (pode haver mais de uma). Além de perguntar quão forte é o relacionamento entre as duas variáveis latentes, a correlação canônica é útil para determinar quantas dimensões são necessárias esclarecer esse relacionamento. A correlação canônica encontra a combinação linear das variáveis que produz a maior correlação com o segundo conjunto das variáveis. Esta combinação linear, ou a “raiz,” são extraídas e o processo é repetido para os dados residuais, com o impedimento que a segunda combinação linear das variáveis não se deve correlacionar com primeira. O processo é repetido até que uma combinação linear sucessiva fique não significativa.

Foram analisadas as correlações canônicas entre as concentrações dos íons (NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , Cl^- , NO_2^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , Oxalato, F^- , HPO_4^{2-}) e as variáveis independentes (*Tipo de Clone*, *Tipo de Meio*, *Tipo de Ensaio*, *Número de Dias de incubação*), num total de 713 casos (Tabela 5-31).

Tabela 5-31: Correlações canônicas.

Número	Correlações Canônicas	Lambda de Wilks	Qui-quadrado	Valor próprio	Percentagem da variância explicada	GL	Valor de p
1	0,964743	0,0312972	2437,08	0,930729	59,03	48	0,0000***
2	0,659989	0,451806	558,932	0,435586	27,63	33	0,0000***
3	0,345566	0,800487	156,553	0,119416	7,57	20	0,0000***
4	0,301595	0,909041	67,0896	0,0909594	5,77	9	0,0000***

A tabela mostra as correlações estimadas entre cada conjunto de variáveis canônicas. Uma vez que quatro valores de p são inferiores a 0,001, aqueles conjuntos possuem correlações estatisticamente muito significativas para um nível de confiança de 99,9%. Este procedimento encontra as combinações lineares de dois conjuntos de variáveis que possuem a maior correlação entre elas. Neste caso, foram formados quatro conjuntos de combinações lineares. O primeiro conjunto de combinações lineares é:

$$-0,0377897 \cdot \text{NH}_4^+ + 0,0127323 \cdot \text{K}^+ + 0,0140482 \cdot \text{Ca}^{2+} - 0,00407791 \cdot \text{Na}^+ + 0,000998015 \cdot \text{Mg}^{2+} + 0,872961 \cdot \text{Cl}^- - 0,0177444 \cdot \text{NO}_2^- + 0,151821 \cdot \text{SO}_4^{2-} - 0,0176052 \cdot \text{NO}_3^- + 0,000513912 \cdot \text{Oxalato} - 0,00646863 \cdot \text{F}^- + 0,0934251 \cdot \text{HPO}_4^{2-}$$

e

$$0,846226 \cdot \text{Tipo de Clone} - 0,000742904 \cdot \text{Tipo de Meio} - 0,527328 \cdot \text{Tipo de Ensaio} - 0,0420813 \cdot \text{Número de Dias de incubação}$$

aqui as variáveis foram em primeiro lugar estandardizadas subtraindo as suas médias e dividindo pelos seus desvios padrão.

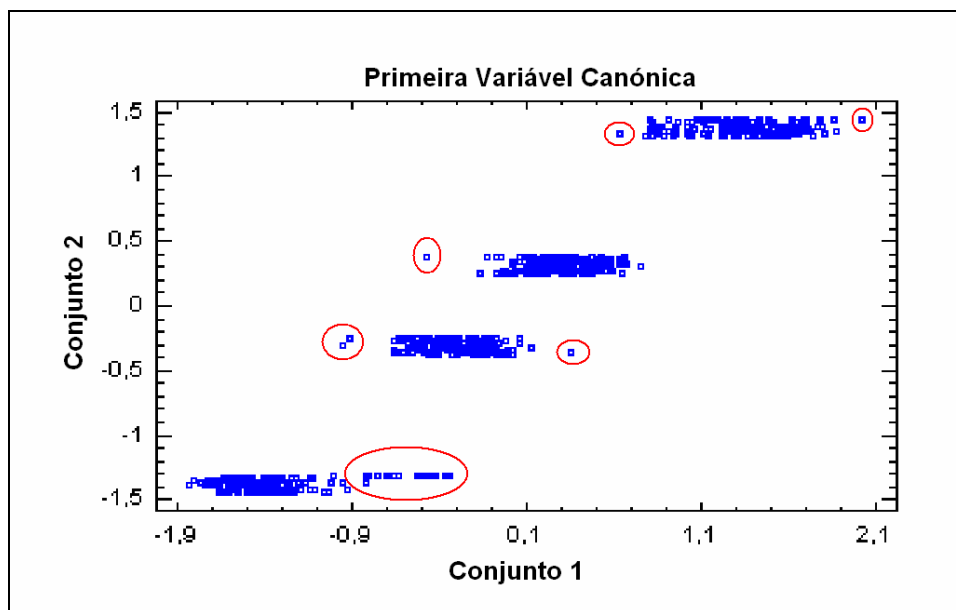


Gráfico 5-1: Representação das correlações canônicas entre as concentrações dos iões e as variáveis independentes.

A representação gráfica da correlação canônica (Gráfico 5-1) mostra uma das correlações canônicas (geralmente a primeira). O eixo das abcissas (X) é a variável canônica que covaria (a variável latente para o conjunto das variáveis independentes). O eixo das ordenadas (Y) é a variável canônica que representa as variáveis. Os pontos são as contabilizações canônicas para cada caso baseadas nas pontuações dos casos em cada uma das variáveis canônicas. Quando as correlações são fortes, os pontos irão formar grupos em locais diferentes do gráfico.

Os casos fora dos grupos formados no gráfico de correlação canônica são *outliers* (valores discrepantes) e podem merecer inspeção ou modelação em separado. No exemplo acima os valores discrepantes estão circundados. Isto é, os gráficos da correlação canônica são um método útil de identificar valores discrepantes ou os casos excepcionais que diferem de outros casos que não compartilham do mesmo teste padrão da correlação entre os conjuntos das variáveis no estudo.

Em muitos estudos a análise dos valores discrepantes pode ser mais interessante, do ponto de vista da investigação, do que os outros valores (MAROCO, 2003).

5.3.3. Avaliação Quantitativa dos Perfis Peptídicos

5.3.3.1. Total do número de bandas

Na Tabela 5-32 apresentam-se as médias relativas ao número total de bandas no tecido

caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Tabela 5-32: Médias relativas ao número total de bandas, nos tecidos calosos (resistente e susceptível), infectados, a crescerem em nove meios de cultura.

Meio de Cultura	Tipo de Clone	Média	Desvio Padrão
MTC-1	Susceptível	32,00	8,485
	Resistente	38,17	16,540
MTC-2	Susceptível	33,13	11,607
	Resistente	33,22	11,796
MTC-3	Susceptível	43,89	20,364
	Resistente	32,11	12,668
MTC-4	Susceptível	39,89	21,001
	Resistente	39,00	13,115
MTC-5	Susceptível	46,39	15,962
	Resistente	37,78	13,603
MTC-6	Susceptível	48,01	15,922
	Resistente	27,33	6,333
MTC-7	Susceptível	35,56	10,905
	Resistente	35,91	12,704
MTC-8	Susceptível	40,00	16,371
	Resistente	41,35	15,882
MTC-9	Susceptível	45,78	18,632
	Resistente	38,48	6,000

Da análise da tabela anterior é possível constatar que para o número total de bandas os valores médios para os tecido resistente variavam de um mínimo de 35,56 (MTC-6) a um máximo de 48,01 bandas (MTC-5), enquanto que para o tecido susceptível variavam de um mínimo de 27,33 (MTC-6) a um máximo de 41,35 bandas (MTC-8).

Em termos médios a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente do número total de bandas no tecido caloso resistente infectado era:

MTC-5 > MTC-4 > MTC-8 > MTC-9 > MTC-2 > MTC-7 > MTC-3 > MTC-1 > MTC-6

No que respeita ao tecido caloso susceptível infectado a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente do número total de bandas era:

MTC-8 > MTC-4 > MTC-9 > MTC-5 > MTC-7 > MTC-2 > MTC-3 > MTC-1 > MTC-6

Na Fig. 5-19 estão representados nove gráficos (que correspondem a 9 combinações de fitorreguladores) dos valores obtidos para o número total de bandas. Estes valores estão graficados em função da cotação do crescimento fúngico (0-5) e do tipo de meio de cultura (MTC-1 a MTC-9).

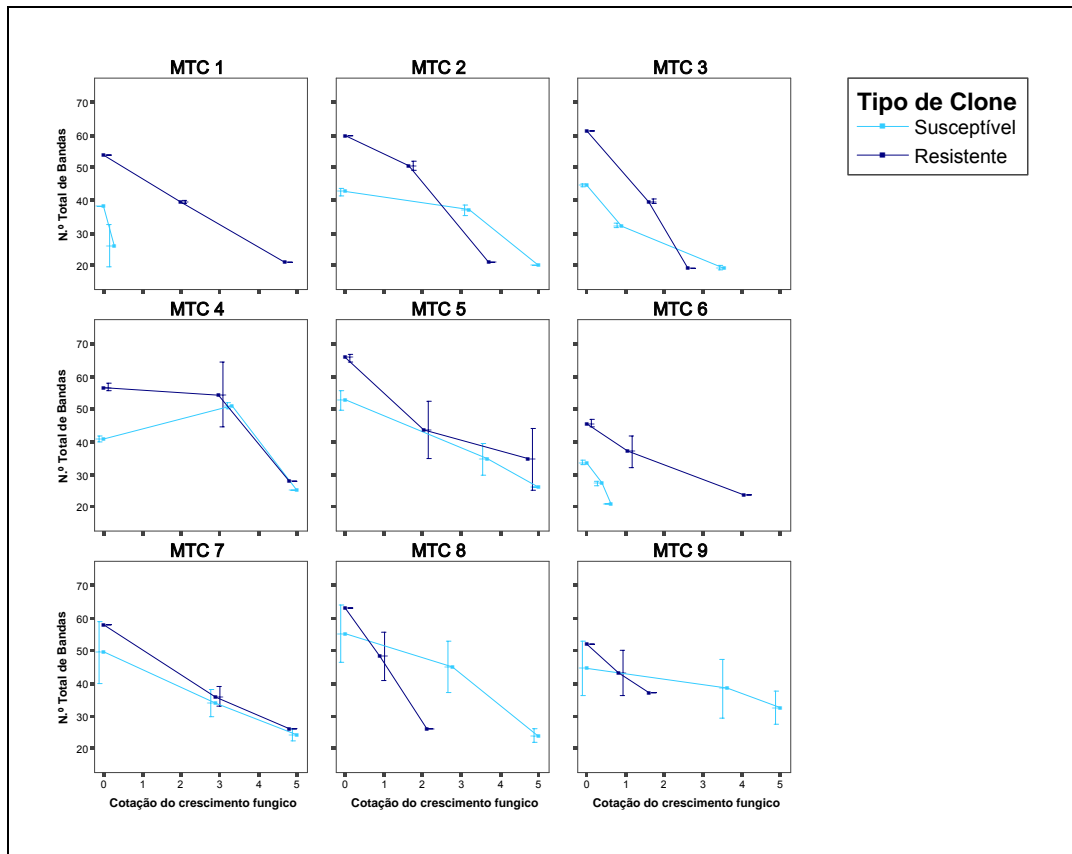


Fig. 5-19: Distribuição do número de bandas nos perfis peptídicos para o número total de bandas em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura.

As barras de erro representam o valor da média somando e subtraindo do valor do desvio padrão ($\bar{x} \pm DP$).

Da análise da figura anterior é possível constatar que quantidade total de bandas é sempre superior para o tecido resistente. Para os dois tipos de tecido verifica-se que ao longo do tempo de interação a tendência é para o número total de bandas ir decrescendo.

Para testar se as diferenças no número total de bandas eram significativas entre o tecido caloso resistente e o susceptível foi aplicado o teste não-paramétrico para duas amostras emparelhadas de Wilcoxon apresentado na Tabela 5-33. Da análise da tabela é possível verificar que para todos os meios de cultura as diferenças para o número total de bandas são estatisticamente muito significativas ($p < 0,001$).

Tabela 5-33: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis número total de bandas e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Meio de Cultura	Z	Sig. assintótica (bilateral)
MTC-1	-4,023	0,000***
MTC-2	-4,020	0,000***
MTC-3	-4,019	0,000***
MTC-4	-4,018	0,000***
MTC-5	-4,018	0,000***
MTC-6	-4,018	0,000***
MTC-7	-5,017	0,000***
MTC-8	-5,018	0,000***
MTC-9	-5,017	0,000***

Importa neste momento ponderar e quantificar o decréscimo do número total de bandas em função do tempo. Para tal foi elaborada a Tabela 5-34 na qual figuram os valores para a taxa de decréscimo do número total de bandas nos nove meios testados.

Tabela 5-34: Taxa de decréscimo do número total de bandas no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Meio de Cultura	Susceptível	Resistente
MTC-1	31,57895	61,11111
MTC-2	53,125	65
MTC-3	56,71642	68,85246
MTC-4	39,02439	50,58824
MTC-5	50,63291	47,08122
MTC-6	37,62376	47,44526
MTC-7	50,84175	55,17241
MTC-8	56,49547	58,73016
MTC-9	26,96629	28,84615

Da análise da tabela anterior é possível constatar que no tecido resistente o maior decréscimo do número total de bandas foi de 68,85% (MTC-3) e o menor de 28,85% (MTC-9). No tecido susceptível o maior decréscimo do número total de bandas foi de 56,72% (MTC-3) e o menor de 26,97% (MTC-9). A taxa de decréscimo é sempre maior para o tecido resistente em cada um dos meios.

A distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente desta taxa para tecido caloso resistente infectado era:

MTC-3 > MTC-2 > MTC-1 > MTC-8 > MTC-7 > MTC-4 > MTC-6 > MTC-5 > MTC-9

No que respeita ao tecido caloso susceptível infectado a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente desta taxa era:

MTC-3 > MTC-8 > MTC-2 > MTC-7 > MTC-5 > MTC-4 > MTC-6 > MTC-1 > MTC-9

Para testar se as diferenças na taxa de decréscimo eram significativas entre o tecido caloso

resistente e o susceptível foi aplicado o teste não-paramétrico para duas amostras emparelhadas de Wilcoxon apresentado na Tabela 5-35.

Tabela 5-35: Prova não paramétrica de Wilcoxon para os pares de variáveis Taxa de decréscimo do número total de bandas e Tipo de meio de cultura ou Tipo de Clone.

Taxa de decréscimo do número de bandas	Z	Sig. assintótica(bilateral)
Tipo de Meio de Cultura	-3,724	0,000***
Tipo de Clone	-3,724	0,000***

Da análise da tabela anterior é possível verificar que todas as diferenças são estatisticamente muito significativas ($p < 0,001$).

5.3.3.2. Número de bandas entre 205 a 100 kDa

Na Tabela 5 36 apresenta-se a estatística descritiva absoluta (isto é, não tendo em consideração cada uma das variáveis independentes) para o número de bandas de péptidos nos tecidos calosos (susceptível e resistente) infectados.

Da análise da Tabela 5-36 é possível constatar que o tecido resistente possui em média um número total de bandas superior ao tecido resistente (42,67 e 35,00, respectivamente). Em relação ao tecido resistente pode dizer-se que possui um número maior de bandas para a classe de pesos moleculares entre 13 e 40 kDa, seguido por 40 e 60 kDa, 5 e 13 kDa, 60 e 100 kDa e 100 e 205 kDa. Já para o tecido caloso susceptível a ordem era 13 e 40 kDa, 5 e 13 kDa, 40 e 60 kDa, 60 e 100 kDa e 100 e 205 kDa. Para os dois tecidos a quarta classe de pesos moleculares é a mais representada, enquanto que as menos representadas são a primeira e a segunda classe (estas são as classe que possuem um maior desvio padrão associado). Entre os dois tipos de clone verifica-se uma distinção, em termos de representatividade, na terceira e na quinta classes de pesos moleculares.

Tabela 5-36: Estatística descritiva absoluta para o número de bandas de péptidos nos tecidos calosos (susceptível e resistente) infectados.

Classes de Pesos Moleculares	Tipo de Clone	Média	Desvio Padrão	Máximo	Mínimo
100 e 205 kDa	Susceptível	2,22	0,667	3	1
	Resistente	3,11	0,601	4	2
	Total	2,67	0,707	4	2
60 e 100 kDa	Susceptível	3,67	1,000	5	3
	Resistente	5,33	0,866	6	4
	Total	4,56	0,726	5	4
40 e 60 kDa	Susceptível	5,89	1,364	8	4
	Resistente	8,89	1,054	10	7
	Total	7,44	1,130	9	6
13 e 40 kDa	Susceptível	17,00	2,000	20	14
	Resistente	19,44	1,810	22	17
	Total	18,11	1,764	21	16
5 e 13 kDa	Susceptível	6,56	0,726	7	5
	Resistente	6,22	1,093	8	5
	Total	6,33	0,707	7	5
N.º Total de Bandas	Susceptível	35,00	4,822	42	27
	Resistente	42,67	4,213	48	36
	Total	39,11	4,197	44	32

Para explicar a interferência da invasão, provocada pelo agente patogénico *Phytophthora cinnamomi*, foram cruzados os valores obtidos para o número de bandas em cada uma das classes (obtidos por electroforese em SDS-PAGE seguida de análise pelo programa Gel-Pro Analyzer 4.5, Media Cybernetics®, L.P., USA) com as cotações do crescimento fúngico. Este último parâmetro permite perceber a amostra do ponto de vista temporal (número de dias de incubação) e do ponto de vista da capacidade invasora por parte do fungo, ou em alternativa, da capacidade de resistência por parte do tecido caloso. Nos gráficos para cada tipo de clone estão representadas três cotações do crescimento fúngico, que correspondem aos dias de interacção 1, 4 e 7. As distribuições do número de bandas nas cinco classes de pesos moleculares em função da cotação de crescimento fúngico sobre o tecido caloso e do meio de cultura estão expressas desde a Fig. 5-20 à Fig. 5-24.

Na Tabela 5-37 apresentam-se as médias relativas ao número de bandas para a primeira classe de pesos moleculares (100-205 kDa) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Tabela 5-37: Médias relativas ao número de bandas para a primeira classe de pesos moleculares (100-205 kDa) nos tecidos calosos (resistente e susceptível) infectados a crescerem em nove meios de cultura.

Meio de Cultura	Tipo de Clone	Média	Desvio Padrão
MTC-1	Susceptível	1,75	0,589
	Resistente	3,00	2,000
MTC-2	Susceptível	1,33	0,333
	Resistente	2,17	2,255
MTC-3	Susceptível	1,67	1,000
	Resistente	2,44	0,770
MTC-4	Susceptível	1,89	0,385
	Resistente	3,00	2,646
MTC-5	Susceptível	2,56	0,839
	Resistente	3,52	1,643
MTC-6	Susceptível	1,78	0,192
	Resistente	2,33	0,577
MTC-7	Susceptível	2,46	1,112
	Resistente	2,33	1,528
MTC-8	Susceptível	2,96	1,532
	Resistente	3,61	3,611
MTC-9	Susceptível	2,44	2,440
	Resistente	2,39	1,512

Da análise da tabela anterior é possível constatar que para a primeira classe de pesos moleculares (100-205 kDa) os valores médios para os tecido resistente variavam de um mínimo de 2,17 (MTC-2) a um máximo de 3,61 bandas (MTC-8), enquanto que para o tecido susceptível variavam de um mínimo de 1,33 (MTC-8) a um máximo de 2,96 bandas (MTC-2). O desvio padrão associado era de elevada grandeza.

Em termos médios a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente do número de bandas para a primeira classe de pesos moleculares no tecido caloso resistente infectado era:

MTC-8 > MTC-5 > MTC-1 > MTC-4 > MTC-3 > MTC-9 > MTC-6 > MTC-7 > MTC-2

No que respeita ao tecido caloso susceptível infectado a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente do número de bandas para a primeira classe de pesos moleculares era:

MTC-8 > MTC-5 > MTC-7 > MTC-9 > MTC-4 > MTC-6 > MTC-1 > MTC-3 > MTC-2

Na Fig. 5-20 estão representados nove gráficos (que correspondem a 9 combinações de fitorreguladores) dos valores obtidos para o número de bandas da primeira classe de pesos moleculares (100-205 kDa). Estes valores estão graficados em função da cotação do crescimento fúngico (0-5) e do tipo de meio de cultura (MTC-1 a MTC-9).

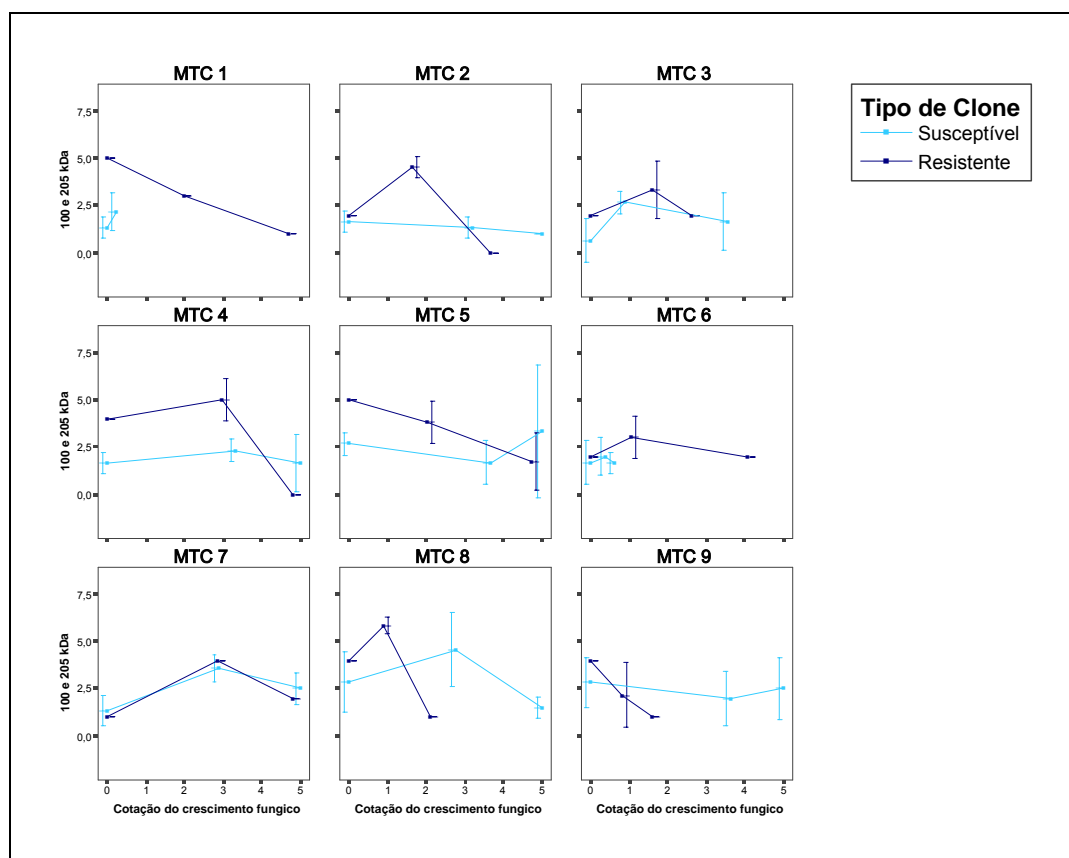


Fig. 5-20: Distribuição do número de bandas nos perfis peptídicos para a classe de pesos moleculares entre 100 e 205 kDa em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura. As barras de erro representam o valor da média somando e subtraindo do valor do desvio padrão ($\bar{x} \pm DP$).

Da análise da figura anterior é possível constatar que o número de bandas na primeira classe de pesos moleculares, e para a maioria dos meios de cultura, é quase sempre superior para o tecido resistente. Contudo, em algumas interações, no final do ensaio, quando a cotação do crescimento fúngico era superior, a quantidade de bandas no tecido susceptível superava a do tecido resistente (MTC-2, 4, 5, 7, 8 e 9).

Para testar se as diferenças no número de bandas para esta classe de pesos moleculares eram significativas foi aplicado o teste não-paramétrico para duas amostras emparelhadas de Wilcoxon apresentado na Tabela 5-38.

Tabela 5-38: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis número de bandas para a primeira classe de pesos moleculares (100-205 kDa) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Meio de Cultura	Z	Sig. assimpótica (bilateral)
MTC-1	-2,250	0,024*
MTC-2	-0,505	0,613 ^{NS}
MTC-3	-1,815	0,070 ^{NS}
MTC-4	-0,122	0,903 ^{NS}
MTC-5	-0,662	0,508 ^{NS}
MTC-6	-2,454	0,014*
MTC-7	-0,709	0,478 ^{NS}
MTC-8	-2,731	0,006**
MTC-9	-0,197	0,844 ^{NS}

Da análise da tabela anterior é possível verificar que, em apenas três meios de cultura as diferenças entre o tecido resistente e o susceptível são estatisticamente significativas, designadamente: MTC-1, MTC-6 ($p < 0,05$) e; MTC-8 ($p < 0,01$).

5.3.3.3. Número de bandas entre 100 a 60 kDa

Na Tabela 5-39 apresentam-se as médias relativas ao número de bandas para a segunda classe de pesos moleculares (60-100 kDa) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Tabela 5-39: Médias relativas ao número de bandas para a segunda classe de pesos moleculares (60-100 kDa) nos tecidos calosos (resistente e susceptível) infectados a crescerem em nove meios de cultura.

Meio de Cultura	Tipo de Clone	Média	Desvio Padrão
MTC-1	Susceptível	2,42	0,354
	Resistente	3,33	2,082
MTC-2	Susceptível	2,56	1,503
	Resistente	5,33	3,786
MTC-3	Susceptível	3,56	1,347
	Resistente	4,67	2,517
MTC-4	Susceptível	3,44	1,018
	Resistente	5,67	3,215
MTC-5	Susceptível	3,78	2,219
	Resistente	6,13	3,557
MTC-6	Susceptível	2,56	0,694
	Resistente	4,17	3,014
MTC-7	Susceptível	4,11	1,456
	Resistente	5,50	2,179
MTC-8	Susceptível	4,61	2,496
	Resistente	5,67	3,512
MTC-9	Susceptível	4,48	1,716
	Resistente	4,61	3,155

Da análise da tabela anterior é possível constatar que para a segunda classe de pesos moleculares (60-100 kDa) os valores médios para os tecido resistente variavam de um mínimo de 3,33 (MTC-1) a um máximo de 6,13 bandas (MTC-5), enquanto que para o tecido susceptível variavam de um mínimo de 2,42 (MTC-8) a um máximo de 4,61 bandas (MTC-1). Também para esta classe o desvio padrão associado era de elevada grandeza.

Em termos médios a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente do número de bandas para a segunda classe de pesos moleculares no tecido caloso resistente infectado era:

MTC-5 > MTC-4 > MTC-8 > MTC-7 > MTC-2 > MTC-3 > MTC-9 > MTC-6 > MTC-1

No que respeita ao tecido caloso susceptível infectado a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente do número de bandas para a segunda classe de pesos moleculares era:

MTC-8 > MTC-9 > MTC-7 > MTC-5 > MTC-3 > MTC-4 > MTC-6 > MTC-2 > MTC-1

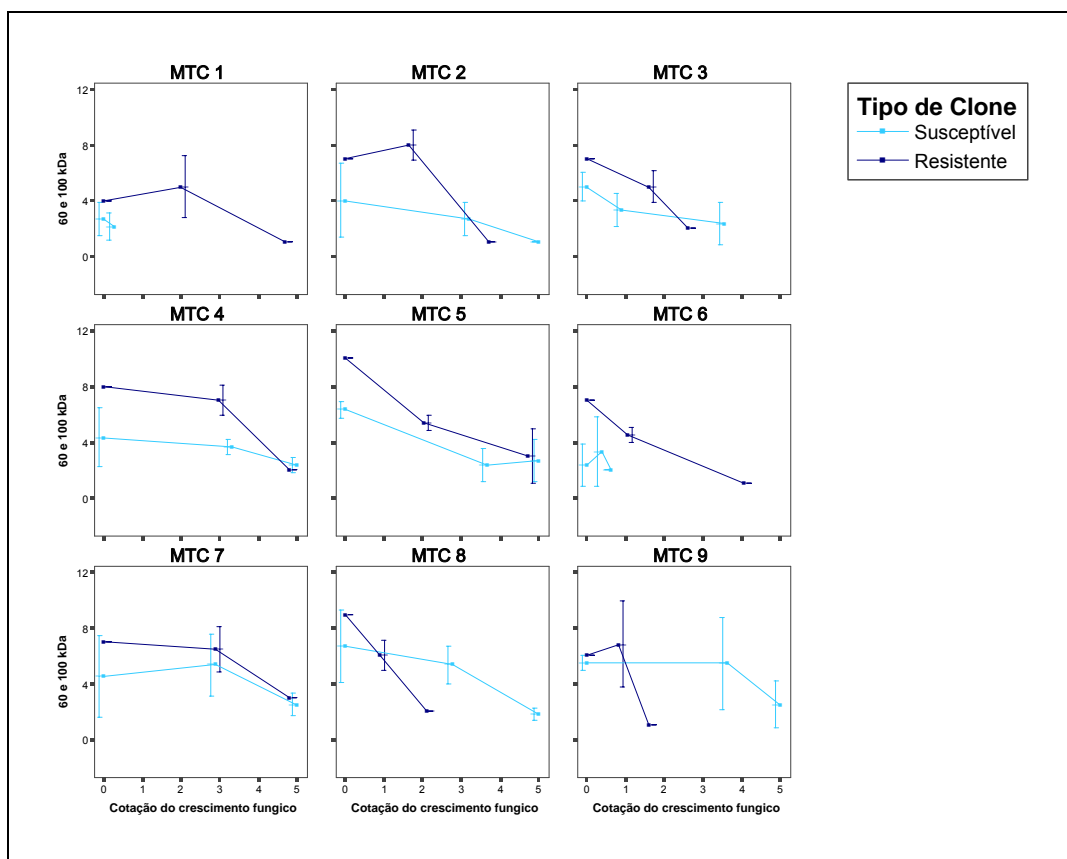


Fig. 5-21: Distribuição do número de bandas nos perfis peptídicos para a classe de pesos moleculares entre 60 e 100 kDa em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura.

As barras de erro representam o valor da média somando e subtraindo do valor do desvio padrão ($\chi \pm DP$).

Na Fig. 5-21 estão representados nove gráficos (que correspondem a 9 combinações de fitorreguladores) dos valores obtidos para o número de bandas da segunda classe de pesos moleculares (60-100 kDa). Estes valores estão graficados em função da cotação do crescimento

fúngico (0-5) e do tipo de meio de cultura (MTC-1 a MTC-9).

Da análise da figura anterior é possível constatar que o número de bandas na segunda classe de pesos moleculares, e para a maioria dos meios de cultura, é quase sempre superior para o tecido resistente. Contudo, na maioria das interações, no final do ensaio, quando a cotação do crescimento fúngico era superior, a quantidade de bandas no tecido susceptível superava a do tecido resistente (as excepções são os meios MTC-1, 6 e 7).

Para testar se as diferenças no número de bandas para esta classe de pesos moleculares eram significativas foi aplicado o teste não-paramétrico para duas amostras emparelhadas de Wilcoxon apresentado na Tabela 5-40.

Tabela 5-40: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis número de bandas para a segunda classe de pesos moleculares (60-100 kDa) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Meio de Cultura	Z	Sig. assintótica (bilateral)
MTC-1	-2,770	0,006**
MTC-2	-2,211	0,027*
MTC-3	-3,150	0,002**
MTC-4	-2,437	0,015*
MTC-5	-2,070	0,038*
MTC-6	-2,767	0,006**
MTC-7	-3,149	0,002**
MTC-8	-3,553	0,000***
MTC-9	-2,890	0,004**

Da análise da tabela anterior é possível verificar que para todos os meios de cultura as diferenças para a segunda classe de pesos moleculares são estatisticamente significativas, embora com graus diferentes de significância, designadamente: MTC-8 ($p < 0,001$); MTC-1, MTC-3, MTC-6, MTC-7, MTC-9 ($p < 0,01$); MTC-2, MTC-4 e MTC-5 ($p < 0,05$).

5.3.3.4. Número de bandas entre 60 a 40 kDa

Na Tabela 5-41 apresentam-se as médias relativas ao número de bandas para a terceira classe de pesos moleculares (40-60 kDa) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Tabela 5-41: Médias relativas ao número de bandas para a terceira classe de pesos moleculares (40-60 kDa) nos tecidos calosos (resistente e susceptível) infectados a crescerem em nove meios de cultura.

Meio de Cultura	Tipo de Clone	Média	Desvio Padrão
MTC-1	Susceptível	4,75	1,296
	Resistente	8,67	3,215
MTC-2	Susceptível	5,44	1,262
	Resistente	8,50	4,093
MTC-3	Susceptível	6,11	2,219
	Resistente	7,83	4,646
MTC-4	Susceptível	7,00	2,517
	Resistente	9,50	3,905
MTC-5	Susceptível	6,44	4,526
	Resistente	9,97	3,272
MTC-6	Susceptível	4,11	1,018
	Resistente	7,67	3,055
MTC-7	Susceptível	6,07	1,178
	Resistente	7,17	1,607
MTC-8	Susceptível	8,09	3,797
	Resistente	9,22	4,765
MTC-9	Susceptível	7,02	2,509
	Resistente	8,72	4,090

Da análise da tabela anterior é possível constatar que para a terceira classe de pesos moleculares (40-60 kDa) os valores médios para os tecido resistente variavam de um mínimo de 7,17 (MTC-7) a um máximo de 9,97 bandas (MTC-5), enquanto que para o tecido susceptível variavam de um mínimo de 4,11 (MTC-6) a um máximo de 8,09 bandas (MTC-8). Também para esta classe o desvio padrão associado era de elevada grandeza.

Em termos médios a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente do número de bandas para a terceira classe de pesos moleculares no tecido caloso resistente infectado era:

MTC-5 > MTC-4 > MTC-8 > MTC-9 > MTC-1 > MTC-2 > MTC-3 > MTC-6 > MTC-7

No que respeita ao tecido caloso susceptível infectado a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente do número de bandas para a terceira classe de pesos moleculares era:

MTC-8 > MTC-9 > MTC-4 > MTC-5 > MTC-3 > MTC-7 > MTC-2 > MTC-1 > MTC-6

Na Fig. 5-22 estão representados nove gráficos (que correspondem a 9 combinações de fitorreguladores) dos valores obtidos para o número de bandas da terceira classe de pesos moleculares (40-60 kDa). Estes valores estão graficados em função da cotação do crescimento fúngico (0-5) e do tipo de meio de cultura (MTC-1 a MTC-9).

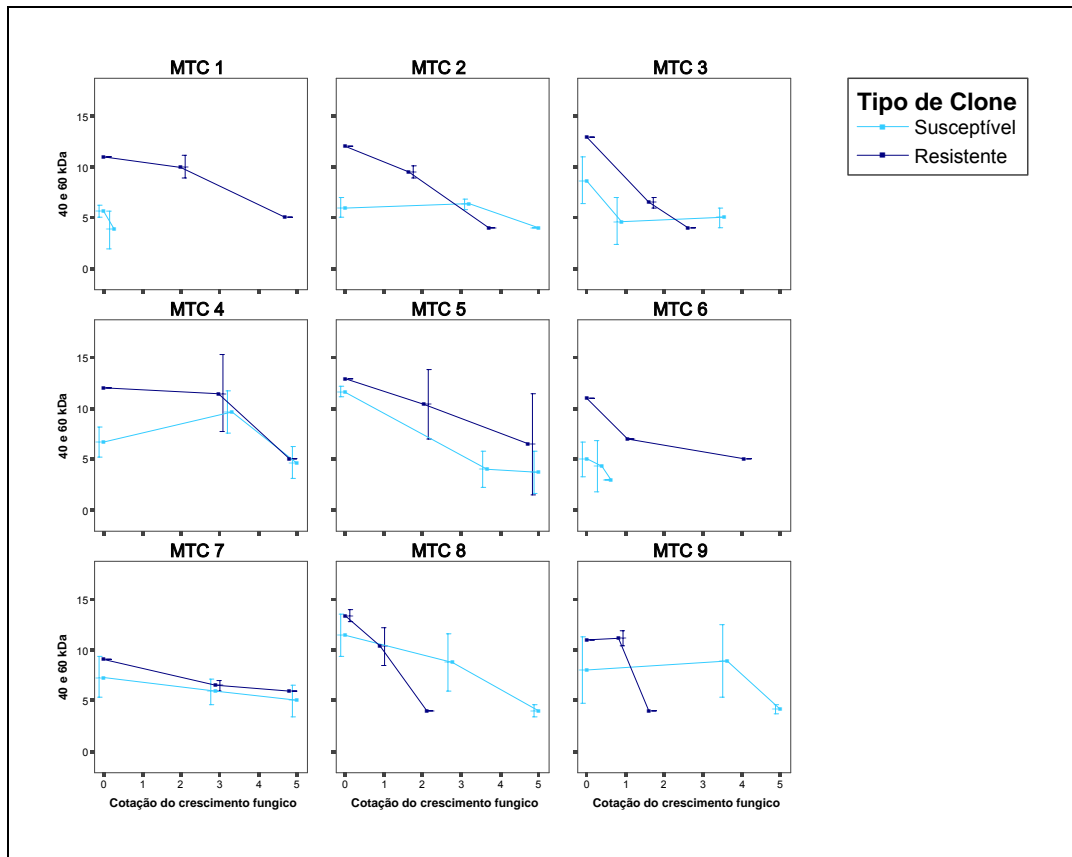


Fig. 5-22: Distribuição do número de bandas nos perfis peptídicos para a classe de pesos moleculares entre 40 e 60 kDa em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura. As barras de erro representam o valor da média somando e subtraindo o valor do desvio padrão ($\bar{x} \pm DP$).

Da análise da figura anterior é possível constatar que o número de bandas na terceira classe de pesos moleculares, e para a maioria dos meios de cultura, é quase sempre superior para o tecido resistente. Contudo, em algumas interações, a partir do quarto dia, quando a cotação do crescimento fúngico era superior, a quantidade de bandas no tecido susceptível superava a do tecido resistente (MTC-2, 8 e 9).

Para testar se as diferenças no número de bandas para esta classe de pesos moleculares eram significativas foi aplicado o teste não-paramétrico para duas amostras emparelhadas de Wilcoxon apresentado na Tabela 5-42.

Tabela 5-42: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis número de bandas para a terceira classe de pesos moleculares (40-60 kDa) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Meio de Cultura	Z	Sig. assintótica (bilateral)
MTC-1	-4,020	0,000***
MTC-2	-3,499	0,000***
MTC-3	-4,020	0,000***
MTC-4	-3,738	0,000***
MTC-5	-2,940	0,003**
MTC-6	-4,029	0,000***
MTC-7	-4,691	0,000***
MTC-8	-4,604	0,000***
MTC-9	-4,439	0,000***

Da análise da tabela anterior é possível verificar que para todos os meios de cultura as diferenças para a terceira classe de pesos moleculares são estatisticamente significativas, embora com graus diferentes de significância. Todos os meios com a excepção do meio MTC-5 ($p < 0,01$) apresentam diferenças para o número de bandas na terceira classe de pesos moleculares muito significativas ($p < 0,001$).

5.3.3.5. Número de bandas entre 40 a 13 kDa

Na Tabela 5-43 apresentam-se as médias relativas ao número de bandas para a quarta classe de pesos moleculares (13-40 kDa) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Tabela 5-43: Médias relativas ao número de bandas para a quarta classe de pesos moleculares (13-40 kDa) nos tecidos calosos (resistente e susceptível) infectados a crescerem em nove meios de cultura.

Meio de Cultura	Tipo de Clone	Média	Desvio Padrão
MTC-1	Susceptível	15,58	3,889
	Resistente	17,44	8,675
MTC-2	Susceptível	16,78	4,671
	Resistente	20,50	8,487
MTC-3	Susceptível	14,67	5,897
	Resistente	18,89	10,178
MTC-4	Susceptível	19,56	7,862
	Resistente	20,11	7,897
MTC-5	Susceptível	17,56	3,097
	Resistente	22,80	8,266
MTC-6	Susceptível	13,67	1,856
	Resistente	16,56	4,993
MTC-7	Susceptível	17,43	8,005
	Resistente	18,72	9,041
MTC-8	Susceptível	18,48	7,304
	Resistente	19,39	9,025
MTC-9	Susceptível	17,67	2,728
	Resistente	19,89	3,657

Da análise da Tabela 5-43 é possível constatar que para a quarta classe de pesos moleculares (13-40 kDa) os valores médios para os tecido resistente variavam de um mínimo de 16,56 (MTC-6) a um máximo de 22,80 bandas (MTC-5), enquanto que para o tecido susceptível variavam de um mínimo de 13,67 (MTC-6) a um máximo de 19,56 bandas (MTC-4). Também para esta classe o desvio padrão associado era de elevada grandeza.

Em termos médios a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente do número de bandas para a quarta classe de pesos moleculares no tecido caloso resistente infectado era:

MTC-5 > MTC-2 > MTC-4 > MTC-9 > MTC-8 > MTC-3 > MTC-7 > MTC-1 > MTC-6

No que respeita ao tecido caloso susceptível infectado a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente do número de bandas para a quarta classe de pesos moleculares era:

MTC-4 > MTC-8 > MTC-9 > MTC-5 > MTC-7 > MTC-2 > MTC-1 > MTC-3 > MTC-6

Na Fig. 5-23 estão representados nove gráficos (que correspondem a 9 combinações de fitorreguladores) dos valores obtidos para o número de bandas da quarta classe de pesos moleculares (13-40 kDa). Estes valores estão graficados em função da cotação do crescimento fúngico (0-5) e do tipo de meio de cultura (MTC-1 a MTC-9).

Da análise da figura 5-23 é possível constatar que o número de bandas na quarta classe de pesos moleculares, e para a maioria dos meios de cultura, é quase sempre superior para o tecido resistente. Contudo, em algumas interações, a partir do quarto dia, quando a cotação do crescimento fúngico era superior, a quantidade de bandas no tecido susceptível superava a do tecido resistente (MTC-4, 5, 8 e 9). Em duas interações a quantidade de bandas no tecido susceptível superava a do tecido resistente apenas no sétimo dia (MTC-2 e MTC-3).

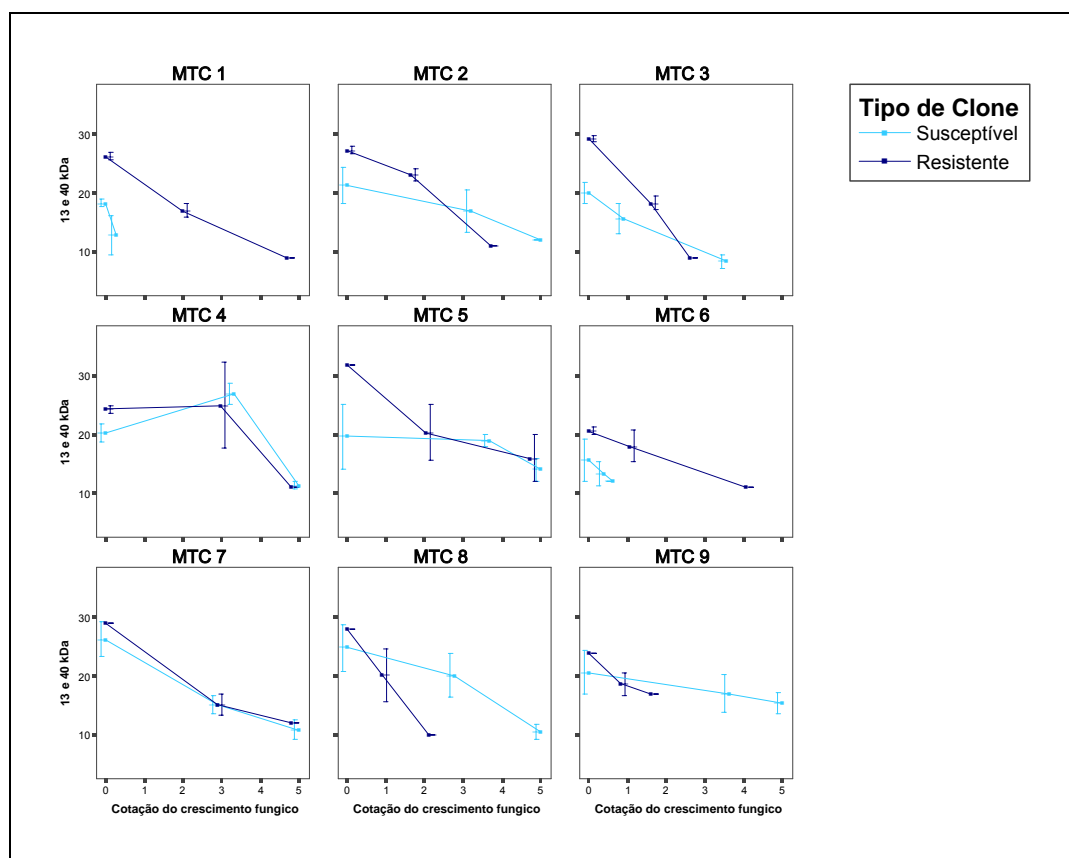


Fig. 5-23: Distribuição do número de bandas nos perfis peptídicos para a classe de pesos moleculares entre 13 e 40 kDa em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura.

As barras de erro representam o valor da média somando e subtraindo do valor do desvio padrão ($\bar{x} \pm DP$).

Para testar se as diferenças no número de bandas para esta classe de pesos moleculares eram significativas foi aplicado o teste não-paramétrico para duas amostras emparelhadas de Wilcoxon apresentado na Tabela 5-44.

Tabela 5-44: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis número de bandas para a quarta classe de pesos moleculares (13-40 kDa) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Meio de Cultura	Z	Sig. assintótica (bilateral)
MTC-1	-4,019	0,000***
MTC-2	-4,019	0,000***
MTC-3	-4,017	0,000***
MTC-4	-4,017	0,000***
MTC-5	-4,017	0,000***
MTC-6	-4,018	0,000***
MTC-7	-5,017	0,000***
MTC-8	-5,017	0,000***
MTC-9	-5,017	0,000***

Da análise da tabela anterior é possível verificar que para todos os meios de cultura as diferenças para a quarta classe de pesos moleculares são estatisticamente muito significativas ($p < 0,001$).

5.3.3.6. Número de bandas entre 13 a 5 kDa

Na Tabela 5-45 apresentam-se as médias relativas ao número de bandas para a quinta classe de pesos moleculares (5-13 kDa) no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Tabela 5-45: Médias relativas ao número de bandas para a quinta classe de pesos moleculares (5-13 kDa) nos tecidos calosos (resistente e susceptível) infectados a crescerem em nove meios de cultura.

Meio de Cultura	Tipo de Clone	Média	Desvio Padrão
MTC-1	Susceptível	7,50	3,536
	Resistente	5,72	1,702
MTC-2	Susceptível	7,11	4,426
	Resistente	7,39	3,713
MTC-3	Susceptível	6,11	4,168
	Resistente	6,06	3,853
MTC-4	Susceptível	7,11	1,836
	Resistente	8,11	2,009
MTC-5	Susceptível	7,44	5,004
	Resistente	5,59	1,951
MTC-6	Susceptível	5,22	3,421
	Resistente	4,83	0,289
MTC-7	Susceptível	5,83	3,617
	Resistente	6,28	4,973
MTC-8	Susceptível	7,20	1,845
	Resistente	7,89	1,644
MTC-9	Susceptível	6,87	1,544
	Resistente	8,44	4,993

Da análise da tabela anterior é possível constatar que para a quinta classe de pesos moleculares (5-13 kDa) os valores médios para os tecido resistente variavam de um mínimo de 4,83 (MTC-6) a um máximo de 8,44 bandas (MTC-9), enquanto que para o tecido susceptível variavam de um mínimo de 5,22 (MTC-6) a um máximo de 7,50 bandas (MTC-1).

Em termos médios a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente do número de bandas para a quinta classe de pesos moleculares no tecido caloso resistente infectado era:

MTC-9 > MTC-4 > MTC-8 > MTC-2 > MTC-7 > MTC-3 > MTC-1 > MTC-5 > MTC-6

No que respeita ao tecido caloso susceptível infectado a distribuição dos meios de cultura por ordem decrescente do número de bandas para a quinta classe de pesos moleculares era:

MTC-1 > MTC-5 > MTC-8 > MTC-4 > MTC-2 > MTC-9 > MTC-3 > MTC-7 > MTC-6

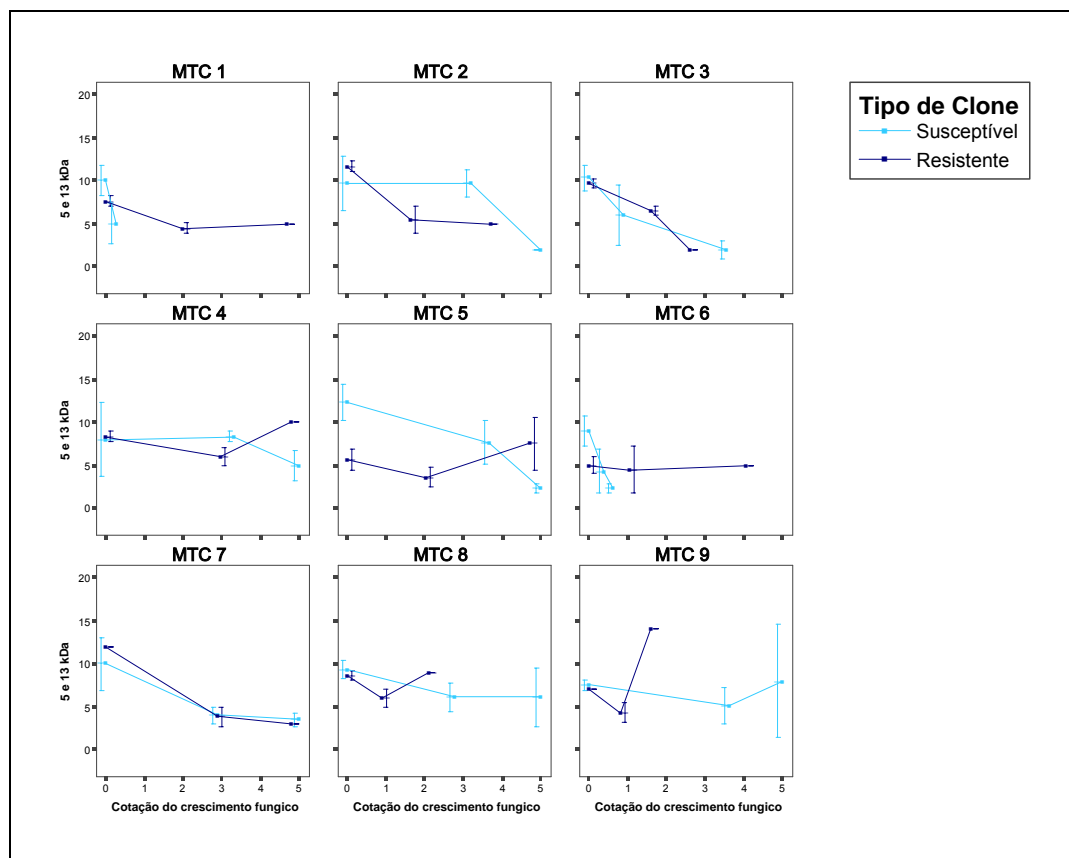


Fig. 5-24: Distribuição do número de bandas nos perfis peptídicos para a classe de pesos moleculares entre 5 e 13 kDa em função da cotação do crescimento fúngico e do tipo de meio de cultura. As barras de erro representam o valor da média somando e subtraindo do valor do desvio padrão ($\bar{x} \pm DP$).

Na Fig. 5-24 estão representados nove gráficos (que correspondem a 9 combinações de fitorreguladores) dos valores obtidos para o número de bandas da quinta classe de pesos moleculares (5-13 kDa). Estes valores estão graficados em função da cotação do crescimento fúngico (0-5) e do tipo de meio de cultura (MTC-1 a MTC-9).

Da análise da figura anterior é possível constatar que no primeiro dia de interação os dois tipos de tecido apresentam aproximadamente o mesmo número de bandas na quinta classe de pesos moleculares (excepção para os meios MTC 5 e 6). O número de bandas tem tendência para decrescer ao longo do tempo de interação nos dois tipos de tecido. Contudo, regista-se um comportamento distinto de aumento no número de bandas no tecido resistente, a partir do quarto dia de interação para os meios MTC-4, 5, 8 e 9. Este comportamento só ocorre no tecido susceptível para o meio MTC-9.

Para testar se as diferenças no número de bandas para esta classe de pesos moleculares eram significativas foi aplicado o teste não-paramétrico para duas amostras emparelhadas de Wilcoxon apresentado na Tabela 5-46.

Tabela 5-46: Prova não paramétrica de Wilcoxon para o par de variáveis número de bandas para a quinta classe de pesos moleculares (5-13 kDa) e a cotação do crescimento fúngico no tecido caloso (resistente e susceptível) infectado a crescer em nove meios de cultura.

Meio de Cultura	Z	Sig. assintótica (bilateral)
MTC-1	-4,021	0,000***
MTC-2	-3,185	0,001**
MTC-3	-3,219	0,001**
MTC-4	-3,915	0,000***
MTC-5	-2,939	0,003**
MTC-6	-4,019	0,000***
MTC-7	-2,584	0,010* ^a
MTC-8	-4,820	0,000***
MTC-9	-4,248	0,000***

^a Valor exacto = 0,00975617430854948

Da análise da tabela anterior é possível verificar que para todos os meios de cultura as diferenças para a quinta classe de pesos moleculares são estatisticamente significativas, embora com graus diferentes de significância, designadamente: MTC-1, MTC-4, MTC-6, MTC-8, MTC-9 ($p < 0,001$); MTC-2, MTC-3, MTC-5 ($p < 0,01$) e; MTC-7 ($p < 0,05$).

No Gráfico 5-2 está representada a distribuição da taxa de decréscimo do número de bandas nos perfis peptídicos para cinco classes de pesos moleculares e para a totalidade dos geles de SDS-PAGE. Os valores graficados são o resultado da aplicação da fórmula para TDNB supramencionada.

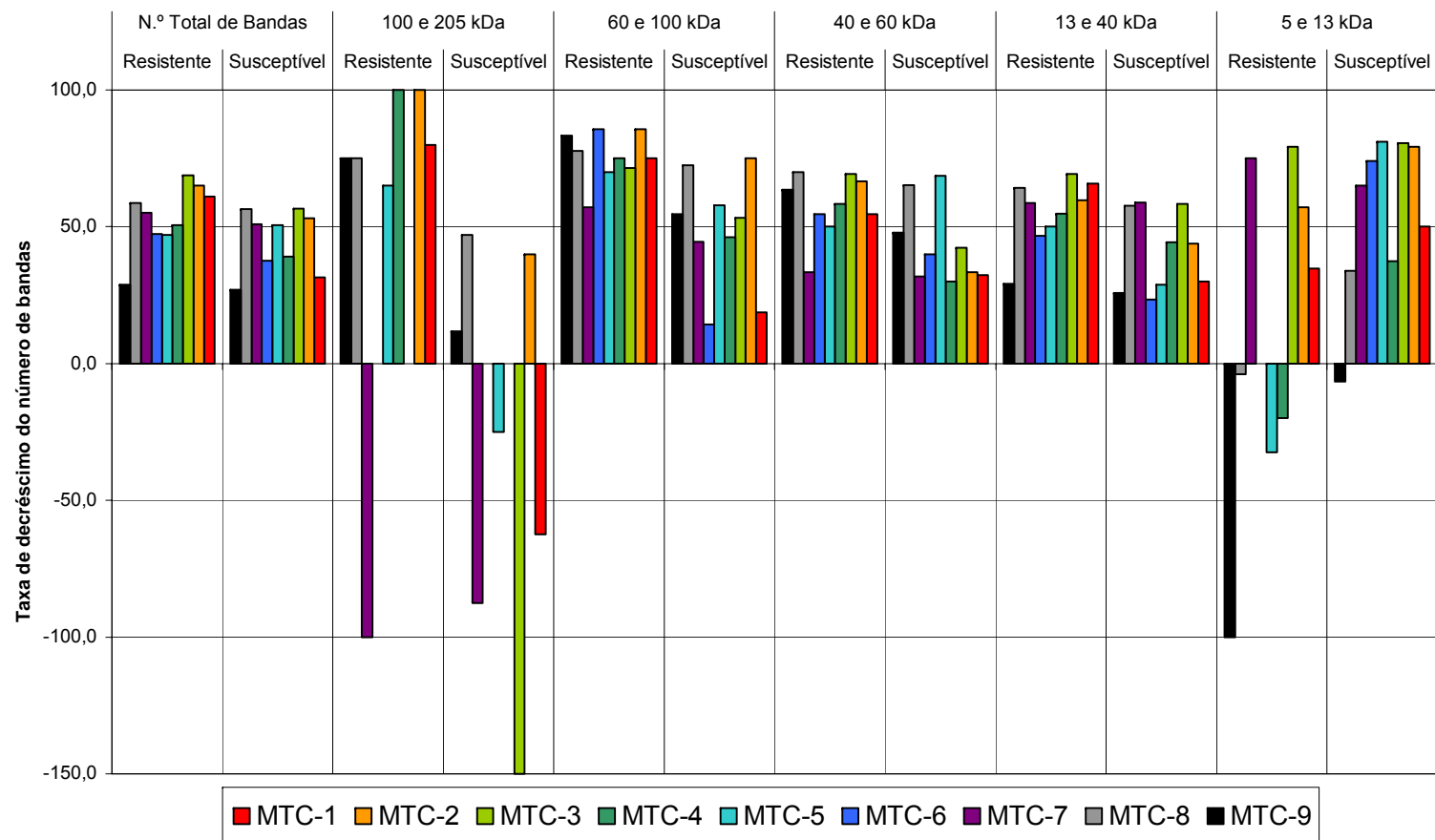


Gráfico 5-2: Distribuição da taxa de decréscimo do número de bandas nos perfis peptídicos para cinco classes de pesos moleculares e para a totalidade dos gels de SDS-PAGE.

Da análise do gráfico anterior é possível atestar que a taxa de decréscimo do número de é maioritariamente positiva (apenas é positiva em dez casos de um total de cento e oito). A primeira e a última classes de pesos moleculares são as únicas onde não se verificam decréscimos do número de bandas em alguns dos meios de cultura.

Analisando a totalidade das bandas presentes nos geles de SDS-PAGE, verifica-se que em todos os meios há uma redução do número de bandas, tanto no tecido caloso infectado resistente como no susceptível. As reduções são globalmente maiores para o tecido resistente. Os meios onde o decréscimo é menor para o tecido resistente é o MTC-9 e para o tecido susceptível MTC-9 e MTC-1. No tecido resistente infectado, ocorrem taxas de decréscimo superiores a 50% em seis meios de cultura (MTC-1, 2, 3, 4, 7, e 8). No tecido susceptível infectado estas taxas ocorrem em cinco meios (MTC-2, 3, 5, 7 e 8).

Na primeira classe de pesos moleculares (205 a 100 kDa) e para o tecido caloso resistente infectado verifica-se que na maioria dos meios testados houve redução do número de bandas acima de 50%, com a excepção de MTC-7 (onde houve aumento do número de bandas), MTC-6 e MTC-3 (onde a taxa de decréscimo foi nula, não houve aumento nem diminuição do número de bandas). Para o tecido caloso susceptível infectado em nenhum meio se registaram taxas de decréscimo do número de bandas acima de 50%, houve três meios onde estas taxas foram positivas (MTC-2, 8 e 9), dois meios onde foi nula (MTC-4 e 6) e em quatro meios foi negativa (ocorreu aumento do número de bandas nos meios MTC-3, 7, 1 e 5, por ordem do módulo da taxa).

Na segunda classe de pesos moleculares (100 a 60 kDa) e para o tecido caloso resistente infectado verifica-se que em todos os meios testados, consistentemente, houve redução do número de bandas acima de 50% (sem excepções, o meio onde a redução foi relativamente menor foi MTC-7). Para o tecido caloso susceptível infectado registou-se uma maior variabilidade, em apenas cinco meios a redução foi acima dos 50% (MTC-2, 3, 5, 8 e 9), no meio MTC-7 a redução foi de 44,4% e nos meios MTC-1 e MTC-6 os decréscimos foram reduzidos (18,8% e 14,3%, respectivamente). Em nenhum dos meios testados para o tecido caloso infectado resistente e susceptível registaram-se taxas de decréscimo negativas para esta classe de pesos moleculares.

Na terceira classe de pesos moleculares (60 a 40 kDa) e para o tecido caloso resistente infectado verifica-se que a taxa de decréscimo do número de bandas, para a maioria dos meios testados, se situava acima de 50% (a única excepção foi MTC-6). Para o tecido caloso susceptível infectado registou-se que a taxa de decréscimo do número de bandas, para a maioria dos meios testados, se situava abaixo de 50% (as excepções foram MTC-5, 8 e 9). Em nenhum dos meios testados para o tecido caloso infectado resistente e susceptível registaram-se taxas de decréscimo negativas para esta classe de pesos moleculares.

Na quarta classe de pesos moleculares (40 a 13 kDa) e para o tecido caloso resistente

infectado verifica-se que a taxa de decréscimo do número de bandas, para a maioria dos meios testados, se situava acima de 50% (as excepções foram MTC-6 e 9). Para o tecido caloso susceptível infectado registou-se que a taxa de decréscimo do número de bandas, para a maioria dos meios testados, se situava abaixo de 50% (as excepções foram MTC-3, 7 e 8). Em nenhum dos meios testados para o tecido caloso infectado resistente e susceptível registaram-se taxas de decréscimo negativas para esta classe de pesos moleculares.

Na última classe de pesos moleculares (13 a 5 kDa) e para o tecido caloso resistente infectado verifica-se que em três meios testados houve redução do número de bandas acima de 50% (MTC-2, 3 e 7), num meios a redução foi abaixo dos 50% (MTC-1), num meio a taxa de decréscimo foi nula (MTC-6) e em quatro meios ocorreu aumento do número de bandas (MTC-4, 5, 8 e 9). Para o tecido caloso susceptível infectado na maioria dos meios ocorreu decréscimo do número de bandas, tendo o MTC-9 sido a única excepção. Houve seis meios de cultura onde as taxas de perda de bandas foram iguais ou superiores a 50% (MTC-1, 2, 3, 5, 6 e 7) dois meios onde foram positivas, mas inferiores a 50% (MTC-4 e 8).

Tendo em conta os perfis peptídicos em SDS-PAGE, na presença de *P. cinnamomi*, com efeito, o número de bandas tende a decrescer significativamente (quase sempre os valores de perda são superiores a 50%), mais no tecido resistente do que nos susceptível ($p < 0,001$). A análise particularizada para cada gama de pesos moleculares revelou-se, igualmente, interessante e assinalável (dado terem sido registadas diferenças estatisticamente significativas). Duas classes de pesos moleculares contribuem com aumentos do número de bandas (primeira e a última), mas todas as outras contribuem com perdas efectivas do número de bandas (perdas sempre superiores a 14%).

5.3.4. Correlações entre as Concentrações em Iões e os Perfis Peptídicos

Com o objectivo de estabelecer relações entre as concentrações iónicas e os perfis peptídicos estabeleceram-se as correlações estatísticas entre estes dois parâmetros. Na Tabela 5-47 apresentam-se as correlações estatísticas entre o número de bandas dos perfis peptídeos (em cinco classes de pesos moleculares) e as concentrações nos iões analisados por electroforese capilar.

Tabela 5-47: Correlações estatísticas entre o número de bandas dos perfis peptídeos e as concentrações em iões.

Iões		Número de bandas dos perfis peptídeos em cinco classes de pesos moleculares				
		PM 205 a 100 kDa	PM 100 a 60 kDa	PM 60 a 40 kDa	PM 40 a 13 kDa	PM 13 a 5 kDa
Catiões	K⁺	0,0338	0,0170	-0,0044	0,0161	-0,1060
	N	(474)	(474)	(474)	(474)	(474)
	Sig.	0,4632 ^{NS}	0,7122 ^{NS}	0,9245 ^{NS}	0,7269 ^{NS}	0,0210*
	Ca²⁺	-0,0232	-0,0527	-0,0784	0,0117	-0,0363
	N	(474)	(474)	(474)	(474)	(474)
	Sig.	0,6150 ^{NS}	0,2522 ^{NS}	0,0882 ^{NS}	0,7988 ^{NS}	0,4299 ^{NS}
	Na⁺	0,0350	-0,0395	-0,0070	0,0364	-0,0689
	N	(474)	(474)	(474)	(474)	(474)
	Sig.	0,4469 ^{NS}	0,3904 ^{NS}	0,8792 ^{NS}	0,4290 ^{NS}	0,1341 ^{NS}
	Mg²⁺	0,0341	0,0812	0,0276	0,1072	0,0246
	N	(474)	(474)	(474)	(474)	(474)
	Sig.	0,4590 ^{NS}	0,0775 ^{NS}	0,5486 ^{NS}	0,0195*	0,5933 ^{NS}
Aniões	Cl⁻	0,0357	0,1132	0,1090	0,0033	-0,0115
	N	(474)	(474)	(474)	(474)	(474)
	Sig.	0,4387 ^{NS}	0,0136*	0,0176*	0,9435 ^{NS}	0,8028 ^{NS}
	SO₄²⁻	0,0003	0,0383	0,0046	-0,0271	-0,0759
	N	(474)	(474)	(474)	(474)	(474)
	Sig.	0,9950 ^{NS}	0,4054 ^{NS}	0,9199 ^{NS}	0,5565 ^{NS}	0,0987 ^{NS}
	Oxalato	-0,1147	0,0477	0,0420	-0,0281	0,0836
	N	(474)	(474)	(474)	(474)	(474)
	Sig.	0,0124*	0,2999 ^{NS}	0,3617 ^{NS}	0,5420 ^{NS}	0,0690 ^{NS}
	HPO₄²⁻	-0,0360	0,0535	-0,0239	-0,0324	-0,0562
	N	(474)	(474)	(474)	(474)	(474)
	Sig.	0,4345 ^{NS}	0,2447 ^{NS}	0,6041 ^{NS}	0,4813 ^{NS}	0,2219 ^{NS}

Da análise da tabela anterior é possível inferir que foram estabelecidas cinco correlações estatísticas ($p < 0,05$) entre o número de bandas dos perfis peptídeos (em cinco classes de pesos moleculares e as concentrações nos iões analisados por electroforese capilar, designadamente: K⁺ – PM 13 a 5 kDa (correlação negativa); Mg²⁺ – PM 40 a 13 kDa (correlação positiva); Cl⁻ – PM 60 a 40 kDa (correlação positiva); Cl⁻ – PM 100 a 60 kDa (correlação positiva) e; Oxalato – PM 205 a 100 kDa (correlação negativa). O número de bandas presentes nas classes de pesos moleculares abaixo de 40 kDa estavam correlacionadas com os cations K⁺ e Mg²⁺, enquanto o número de bandas presentes nas classes de pesos moleculares acima de 40 kDa estavam correlacionadas com os aniões Cl⁻ e Oxalato. As correlações positivas ocorreram entre os pesos moleculares 100 a 40 kDa e o Cl⁻ e entre os pesos moleculares 40 a 13 kDa e o Mg²⁺ e as correlações negativas ocorreram entre os pesos moleculares 205 a 100 kDa e o oxalato e entre os pesos moleculares 15 a 5 kDa e o K⁺.

5.3.5. Análise de Componentes Principais

Com o objectivo de entender o modelo de análise aplicado neste sistema recorreu-se à

Análise de Componentes Principais expressa na Tabela 5-48.

Tabela 5-48: Análise de Componentes Principais

Parâmetros	N.º de Componente				
	1	2	3	4	5
PM 205 a 100 kDa	0,321507	0,00419027	-0,00893528	-0,376075	-0,198318
PM 100 a 60 kDa	0,391551	-0,00944154	0,121702	-0,31682	0,329894
PM 60 a 40 kDa	0,472137	-0,0477201	0,045522	-0,113026	0,190218
PM 40 a 13 kDa	0,438909	-0,0197299	-0,112046	0,223713	-0,265223
PM 13 a 5 kDa	0,123142	-0,101136	-0,131248	0,721653	-0,162447
N.º Total de Bandas	0,545201	-0,0552555	-0,0559465	0,164394	-0,0806323
K⁺	0,0314244	0,547159	-0,146746	-0,0434005	0,0332353
Ca²⁺	-0,0185896	0,384421	-0,14066	0,0258753	-0,140329
Na⁺	0,021671	0,481819	-0,200879	-0,0524609	-0,089851
Mg²⁺	0,0871648	0,464092	-0,108854	0,129095	0,193309
Cl⁻	0,0735534	0,154735	0,523427	0,112323	-0,0207672
SO₄²⁻	0,0180507	0,239044	0,602576	0,117867	-0,121024
Oxalato	0,0114194	0,026839	0,0432384	0,309442	0,78095
HPO₄²⁻	-0,00956511	0,0862952	0,466542	0,0576794	-0,145685

Da análise da tabela anterior é possível inferir que foram estabelecidas cinco componentes principais. As variáveis com maior peso na primeira componente foram o número de bandas nas cinco classes de pesos moleculares e na totalidade das bandas nos geles de SDS-PAGE. Na segunda componente foram as concentrações dos cátions (K⁺, Ca²⁺, Na⁺ e Mg²⁺). Na terceira componente, foram as concentrações de alguns dos aniões (Cl⁻, SO₄²⁻ e HPO₄²⁻). Na quarta componente, foram o número de bandas da classe de pesos moleculares entre 13 e 5 kDa e 40 a 13 kDa e a concentração do anião oxalato. Na quinta componente foram o número de bandas da classe de pesos moleculares entre 100 e 60 kDa e a concentração do anião oxalato.

5.4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Pouca ou nenhuma atenção tem sido dada à possibilidade de um ou mais reguladores de crescimento possam ser cruciais no desenvolvimento da doença antes de outros sintomas serem observados (CAHILL *et al.*, 1986). HABERLACH *et al.* (1978) concluíram que havia uma modificação na resistência induzida pelas citocininas (cinetina e 2ip). Com o objectivo de testemunhar a influência dos reguladores em tecido caloso de *Quercus suber*, os clones seleccionados foram testados contra nove meios de cultura, cuja composição variava no que se refere às concentrações em reguladores de crescimento (Tabela 5-1). Este ensaio teve por objectivo verificar se a composição em reguladores de crescimento (tanto as citocininas como as auxinas), podia ou não induzir resistência/susceptibilidade nos clones ensaiados. Para a cotação do crescimento fúngico recorreu-se de novo à escala de HELGESON *et al.* (1972).

No que se refere à cotação do crescimento fúngico sobre os tecidos calosos, assinala-se que o tecido resistente mostra um padrão mais homogêneo que o tecido susceptível. O tecido susceptível mostra menor cotação fúngica nos meios MTC-1 (5,37:0,44 μM)¹⁵, MTC-3 (5,37:0,44 μM) e MTC-6 (10,74:2,22 μM). Nos meios MTC-8 (8,06:4,44 μM) e MTC-9 (10,74:4,44 μM), a cotação do crescimento fúngico é aumentada, aparentando, os tecidos, uma reacção de maior susceptibilidade. No tecido susceptível à medida que se aumenta a concentração em citocinina o quadro de infecção piora, passando de uma resposta resistente para uma resposta susceptível ou muito susceptível. O aumento da concentração em auxina apenas atenuava o efeito do aumento da citocinina.

Por outro lado, o tecido resistente mostra menor cotação do crescimento fúngico nos meios MTC-2 (5,37:0,44 μM), MTC-3 (5,37:0,44 μM), MTC-6 (10,74:2,22 μM), MTC-8 (8,06:4,44 μM) e MTC-9 (10,74:4,44 μM). Nos meios MTC-4 (5,37:2,22 μM) e MTC-7 (5,37:4,44 μM), a cotação do crescimento fúngico é aumentada, aparentando, os tecidos, uma reacção de maior susceptibilidade. No tecido resistente apenas quando a concentração em auxina é mínima é que a citocinina possui um efeito de aumento da sintomatologia de infecção. Também para este tecido, o aumento da concentração da auxina parece atenuar os efeitos produzidos pela citocinina.

O balanço óptimo para uma resistência máxima no tecido susceptível era 10,74 μM de NAA e 2,22 μM de BAP e no tecido resistente era de 10,74 μM de NAA e 4,44 μM de BAP. Surpreendentemente, os resultados deste estudo, em parte, aproximam-se aos de HABERLACH *et al.* (1978) que utilizaram tecido caloso resistente de *Nicotiana tabacum* com zoósporos de *Phytophthora parasitica* e obtiveram um balanço óptimo para uma resistência máxima de 11,5 μM IAA e de 1 μM de K ou de 23 μM IAA e de 5 μM de K. No caso de *Quercus suber* parece ser necessária uma concentração em citocininas superior para que o tecido supere a agressão provocada pelo agente patogénico (*Phytophthora cinnamomi*).

O balanço de susceptibilidade máxima no tecido susceptível era de 8,06 μM de NAA e 4,44 μM de BAP ou de 10,74 μM de NAA e 4,44 μM de BAP e do tecido resistente era de 5,37 μM de NAA e 2,22 μM de BAP ou de 5,37 μM de NAA e 4,44 μM de BAP. No estudo citado anteriormente, o balanço de maior susceptibilidade era de 10 μM de K e de 10 μM de IAA ou de 10 μM de K e de 11,5 μM de IAA (HABERLACH *et al.*, 1978). Neste estudo a susceptibilidade parece surgir quando há uma relação 10:10 entre a auxina e a citocinina. Já para *Quercus suber* a relação entre auxina e citocinina era de 18:10 e 24:10 para o tecido susceptível e para o tecido resistente ou de apenas 12:10 para o tecido resistente.

Para HABERLACH *et al.* (1978) a adição de K eliminava o efeito da resposta hipersensível e diminuía drasticamente a resistência do tecido caloso. Para *Q. suber* a diminuição de BAP acelerava o efeito da resposta hipersensível como também aumentava, de forma assinalável, a resistência sobretudo para o tecido susceptível.

¹⁵ Entre parênteses relação entre auxina e citocinina (NAA:BAP)

Para além da cotação do crescimento fúngico sobre os tecidos calosos foram analisados os iões (aniões e catiões) pela técnica da electroforese capilar e comparados os resultados por análise estatística multifactorial. As concentrações ($\mu\text{g/g.p.f.}$) dos iões NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , NO_2^- , HPO_4^{2-} , F^- e ião oxalato foram analisadas em função do Tipo de clone (resistente ou susceptível), Tipo de ensaio (presença ou ausência de zoósporos de *P. cinnamomi*), Tipo de Meio (MTC-1 a MTC-9) e Número de dias de incubação (1 a 7 dias).

A concentração do catião NH_4^+ variava desde um máximo de 387,067 e um mínimo de 0,0000 $\mu\text{g/g.p.f.}$. A média da amostra é 25,28767 e o desvio padrão de 49,560103. A concentração deste catião decresce do tecido resistente para o susceptível. No tecido resistente é máxima para os meios MTC-5, MTC-6 e MTC-9 e mínima para os meios MTC-3 e MTC-8. No tecido susceptível é máxima para o meio MTC-1 e mínima para os meios MTC-9 e MTC-2. Tanto para o tecido resistente como para o susceptível a concentração deste catião atinge valores mínimos ao sétimo dia. A prova estatística não paramétrica de Wilcoxon revelou que as diferenças encontradas entre o tecido resistente e o susceptível para a concentração em NH_4^+ são estatisticamente significativas, apenas três meios de cultura, designadamente: MTC-1 ($p < 0,001$); MTC-6 ($p < 0,001$); e MTC-3 ($p < 0,01$).

A concentração do catião K^+ variava desde um máximo de 1401,697 e um mínimo de 88,136 $\mu\text{g/g.p.f.}$. A média da amostra é 642,15315 e o desvio padrão de 211,260673. No tecido resistente a concentração deste catião é máxima para os meios MTC-5, MTC-9 e MTC-6 e mínima para os meios MTC-7 e MTC-1. No tecido susceptível é máxima para os meios MTC-5 e MTC-9 e mínima para os meios MTC-7 e MTC-3. Tanto para o tecido resistente como para o susceptível a concentração deste catião atinge quase sempre valores mínimos ao sétimo dia. A prova estatística não paramétrica de Wilcoxon revelou que as diferenças encontradas entre o tecido resistente e o susceptível para a concentração em K^+ são estatisticamente muito significativas em todos os meios de cultura ($p < 0,001$).

A concentração do catião Ca^{2+} variava desde um máximo de 95,648 e um mínimo de 2,227 $\mu\text{g/g.p.f.}$. A média da amostra é 31,58430 e o desvio padrão de 14,100174. Em geral, a concentração deste catião decresce do tecido resistente para o susceptível. No tecido resistente é máxima para o meio MTC-5 e mínima para o meio MTC-1. No tecido susceptível é máxima para o meio MTC-2 e mínima para os meios MTC-7 e MTC-9. Tanto para o tecido resistente como para o susceptível a concentração deste catião atinge quase sempre valores mínimos ao sétimo dia. A prova estatística não paramétrica de Wilcoxon revelou que as diferenças encontradas entre o tecido resistente e o susceptível para a concentração em Ca^{2+} são estatisticamente muito significativas em todos os meios de cultura ($p < 0,001$).

A concentração em Na^+ variava desde um máximo de 146,895 e um mínimo de 23,526 $\mu\text{g/g.p.f.}$. A média da amostra é 77,11701 e o desvio padrão de 21,950890. No tecido resistente a concentração deste catião é máxima para os meios MTC-4 e MTC-3 e mínima para os

meios MTC-1 e MTC-5. No tecido susceptível é máxima para o meio MTC-4 e mínima para o meio MTC-1. Tanto para o tecido resistente como para o susceptível a concentração deste catião atinge quase sempre valores mínimos ao quinto dia. A prova estatística não paramétrica de Wilcoxon revelou que as diferenças encontradas entre o tecido resistente e o susceptível para a concentração em Na^+ são estatisticamente muito significativas em todos os meios de cultura ($p < 0,001$).

A concentração em Mg^{2+} variava desde um máximo de 82,908 e um mínimo de 2,413 $\mu\text{g/g.p.f.}$. A média da amostra é 27,40044 e o desvio padrão de 11,876216. No tecido resistente a concentração deste catião é máxima para os meios MTC-5 e MTC-9 e mínima para os meios MTC-6 e MTC-2. No tecido susceptível é máxima para os meios MTC-1 e MTC-5 e mínima para o meio MTC-4. Tanto para o tecido resistente como para o susceptível a concentração deste catião atinge quase sempre valores mínimos ao sétimo dia. A prova estatística não paramétrica de Wilcoxon revelou que as diferenças encontradas entre o tecido resistente e o susceptível para a concentração em Mg^{2+} são estatisticamente muito significativas em todos os meios de cultura ($p < 0,001$).

A concentração em Cl^- variava desde um máximo de 207,102 e um mínimo de 60,118 $\mu\text{g/g.p.f.}$. A média da amostra é 130,68879 e o desvio padrão de 46,757479. Em geral, a concentração deste anião decresce do tecido susceptível para o resistente. No tecido resistente é máxima para o meio MTC-9 e mínima para o meio MTC-1. No tecido susceptível é máxima para o meio MTC-3 e mínima para o meio MTC-1. Sobretudo para o tecido resistente os valores mínimos são atingidos ao sétimo dia. A prova estatística não paramétrica de Wilcoxon revelou que as diferenças encontradas entre o tecido resistente e o susceptível para a concentração em Cl^- são estatisticamente muito significativas em todos os meios de cultura ($p < 0,001$).

A concentração em NO_2^- variava desde um máximo de 168,661 e um mínimo de 0,255 $\mu\text{g/g.p.f.}$. A média da amostra é 5,62249 e o desvio padrão de 21,600263. No tecido resistente a concentração deste anião é máxima para o meio MTC-4 e mínima para os meios MTC-1, MTC-3 e MTC-6. No tecido susceptível é máxima para o meio MTC-8 e mínima para os meios MTC-1, MTC-3, MTC-4, MTC-5 e MTC-6. Em geral, os valores mínimos são atingidos ao sétimo dia. A prova estatística não paramétrica de Wilcoxon revelou que as diferenças encontradas entre o tecido resistente e o susceptível para a concentração em NO_2^- são estatisticamente significativas em sete meios de cultura, designadamente: MTC-3, MTC-5, MTC-6 e MTC-7 ($p < 0,001$); MTC-2 e MTC-4 ($p < 0,01$); MTC-9 ($p < 0,05$).

A concentração em SO_4^{2-} variava desde um máximo de 294,789 e um mínimo de 88,887 $\mu\text{g/g.p.f.}$. A média da amostra é 184,48864 e o desvio padrão de 56,885277. A concentração deste anião decresce do tecido susceptível para o resistente. No tecido resistente é máxima para o meio MTC-1 e mínima para o meio MTC-6. No tecido susceptível é máxima para o meio MTC-7 e mínima para o meio MTC-3. Em geral, tanto para o tecido resistente como para o

susceptível os valores mínimos são atingidos ao sétimo dia. A prova estatística não paramétrica de Wilcoxon revelou que as diferenças encontradas entre o tecido resistente e o susceptível para a concentração em SO_4^{2-} são estatisticamente muito significativas em todos os meios de cultura ($p < 0,001$).

A concentração em NO_3^- variava desde um máximo de 217,789 e um mínimo de 0,293 $\mu\text{g/g.p.f.}$. A média da amostra é 9,33677 e o desvio padrão de 31,333592. No tecido resistente a concentração deste anião é máxima para o meio MTC-2 e mínima para o meio MTC-3. No tecido susceptível é máxima para o meio MTC-5 e mínima para os meios MTC-1 e MTC-3. Em geral, os valores mínimos são atingidos ao sétimo dia. A prova estatística não paramétrica de Wilcoxon revelou que as diferenças encontradas entre o tecido resistente e o susceptível para a concentração em NO_3^- são estatisticamente significativas em três meios de cultura, designadamente: MTC-3 ($p < 0,001$); MTC-4 e MTC-7 ($p < 0,05$).

A concentração em oxalato variava desde um máximo de 168,234 e um mínimo de 0,820 $\mu\text{g/g.p.f.}$. A média da amostra é 21,41576 e o desvio padrão de 25,070502. Em geral a concentração deste anião é superior no tecido resistente. No tecido resistente a concentração é máxima para o meio MTC-7 e mínima para o meio MTC-8. No tecido susceptível é máxima para o meio MTC-1 e mínima para os meios MTC-7 e MTC-3. De assinalar que, tanto num tecido caloso como no outro, quando se regista uma resposta de maior resistência a tendência é de diminuição da concentração em oxalato. A prova estatística não paramétrica de Wilcoxon revelou que as diferenças encontradas entre o tecido resistente e o susceptível para a concentração em oxalato são estatisticamente significativas em todos os meios de cultura ($p < 0,01$).

A concentração em F^- variava desde um máximo de 154,770 e um mínimo de 0,236 $\mu\text{g/g.p.f.}$. A média da amostra é 3,02249 e o desvio padrão de 12,377136. Em geral, a concentração deste anião decresce do tecido resistente para o tecido susceptível. No tecido resistente a concentração é máxima para o meio MTC-5 e mínima para os meios MTC-8 e MTC-1. No tecido susceptível é máxima para o meio MTC-5 e mínima para os meios MTC-3 e MTC-7. A prova estatística não paramétrica de Wilcoxon revelou que as diferenças encontradas entre o tecido resistente e o susceptível para a concentração em F^- são estatisticamente significativas em cinco meios de cultura, designadamente: MTC-3 e MTC-7 ($p < 0,001$); MTC-1, MTC-4 e MTC-8 ($p < 0,05$).

A concentração em HPO_4^{2-} variava desde um máximo de 600,450 e um mínimo de 136,021 $\mu\text{g/g.p.f.}$. A média da amostra é 283,05055 e o desvio padrão de 123,656119. A concentração deste anião decresce do tecido susceptível para o tecido resistente. No tecido resistente a concentração é máxima para o meio MTC-5 e mínima para os meios MTC-8 e MTC-1. No tecido susceptível é máxima para o meio MTC-7 e mínima para o meio MTC-1. A prova estatística não paramétrica de Wilcoxon revelou que as diferenças encontradas entre o tecido

resistente e o susceptível para a concentração em HPO_4^{2-} são estatisticamente muito significativas em todos os meios de cultura ($p < 0,001$).

A análise das correlações canónicas revelou 4 correlações (quatro conjuntos de combinações lineares) muito significativamente diferentes ($p < 0,001$), isto é, este modelo permitiu determinar quatro dimensões necessárias esclarecer o relacionamento das concentrações dos iões (NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , Cl^- , NO_2^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , Oxalato, F^- , HPO_4^{2-}) com as variáveis independentes (*Tipo de Clone*, *Tipo de Meio*, *Tipo de Ensaio*, *Número de Dias de Incubação*).

Atendendo aos resultados obtidos para o número total de bandas, e não tendo em consideração a interferência da CCF, nem do tipo de meio, pode dizer-se que o tecido resistente possui um número total de bandas médio de 42,67 que é superior ao do tecido resistente ($\bar{x}=35,00$). No tecido resistente a classe de pesos moleculares com maior número de bandas 13 e 40 kDa, seguida por 40 e 60 kDa, 5 e 13 kDa, 60 e 100 kDa e 100 e 205 kDa. Já para o tecido caloso susceptível a ordem era 13 e 40 kDa, 5 e 13 kDa, 40 e 60 kDa, 60 e 100 kDa e 100 e 205 kDa. Daqui se infere que para os dois tipos de tecido caloso infectado a classe mais representada é a quarta e as menos representadas eram a primeira e a segunda. Para os dois tecidos a quarta classe de pesos moleculares é a mais representada, enquanto que as menos representadas são a primeira e a segunda classe. A terceira e a quinta classe de pesos moleculares constituem as classes diferentemente representadas para os dois tipos de tecidos calosos infectados.

Após cruzamento dos valores obtidos para o número de bandas em cada uma das classes com as cotações do crescimento fúngico nos dias 1, 4 e 7 de interacção com o agente patogénico foram observadas similitudes e diferenças assinaláveis. Os perfis peptídicos foram analisados numa primeira fase em função da totalidade do número de bandas obtidas pelo programa informático Gel-Pro Analyzer 4.5 (Media Cybernetics®, L.P., USA). Numa segunda fase, os perfis peptídicos foram analisados particularizando as ocorrências de bandas em cinco classes de pesos moleculares (205-100, 100-60, 60-40, 40-13 e 13-5 kDa).

Na presença de *P. cinnamomi*, a quantidade média do número de bandas para o tecido caloso resistente variava de um mínimo de 35,56 (MTC-6) a um máximo de 48,01 (MTC-5), enquanto que para o tecido caloso susceptível de um mínimo de 27,33 (MTC-6) a um máximo de 41,35 (MTC-8). Para todos os meios o valor máximo surgia no primeiro dia de interacção (tecido resistente valor máximo 66 bandas em MTC-5 no primeiro dia, tecido susceptível valor máximo 55 bandas em MTC-8 no primeiro dia) enquanto que o valor mínimo surgia ao sétimo dia de interacção (tecido resistente valor mínimo 19 bandas em MTC-3 no sétimo dia, tecido susceptível valor mínimo 19 bandas em MTC-3 no sétimo dia). Por um lado, a quantidade total de bandas é sempre superior para o tecido resistente infectado, por outro, para os dois tipos de tecido verifica-se que ao longo do tempo de interacção, e em todos os meios testados, há um declínio do número total de bandas (Fig. 5-19). As diferenças encontradas para a quantificação do número total de bandas são estatisticamente muito significativas ($p < 0,001$) para um nível de confiança

superior a 99%.

Quando calculada a taxa de decréscimo do número de bandas totais (entre o dia 1 e o dia 7) é possível constatar que no tecido resistente o decréscimo máximo foi de 68,85% (MTC-3) e o mínimo de 28,85% (MTC-9) e no tecido susceptível máximo foi de 56,72% e 56,50% (MTC-3 e MTC-8, respectivamente) e o mínimo de 26,97% (MTC-9). No caso da interacção com o tecido caloso resistente no meio MTC-9 eram perdas cerca de 29% de bandas, nos meios MTC-5 e 6 cerca de 47% e nos meios MTC-1, 2, 3, 4, 7 e 8, as perdas eram superiores a 50%. Para a interacção com o tecido susceptível no meio MTC-9 eram perdas cerca de 27% de bandas, nos meios MTC-1, 6 e 4 entre 30-40%, e nos meios MTC-2, 3, 5, 7 e 8, as perdas eram superiores a 50%. Em cada um dos meios analisados a taxa de decréscimo é sempre maior para o tecido resistente. As diferenças encontradas para a taxa de decréscimo do número de bandas, tanto em função do tipo de meio, como em função do tipo de clone são estatisticamente muito significativas ($p < 0,001$) para um nível de confiança superior a 99%.

Passando agora para a análise do número de bandas nas cinco gamas de pesos moleculares na primeira classe de pesos moleculares (100-205 kDa) os valores médios para o tecido resistente variavam de um mínimo de 2,17 (MTC-2) a um máximo de 3,61 bandas (MTC-8). Para esta classe de pesos moleculares, o valor máximo do número de bandas surgia para o primeiro dia (MTC-1, 5 e 9) ou para o quarto dia de interacção (MTC-2, 3, 4, 6, 7, e 8). Para o tecido resistente o valor máximo de 6 bandas surgia para o meio MTC-8 no quarto dia de interacção. Para o tecido susceptível o valor máximo de 5 bandas surgia igualmente para o meio MTC-8 no quarto dia de interacção. O valor mínimo para o tecido resistente surgia para o meio MTC-2 e MTC-4 sem o aparecimento de qualquer banda. O valor mínimo para o tecido susceptível com a ocorrência de uma única banda surgiu para os meios MTC-1, 2, 3 e 7 no primeiro dia de interacção e para o meio MTC-2 no sétimo dia. Pela análise da Fig. 5-20 é possível verificar que para a classe de pesos moleculares entre 205 e 100 kDa há uma tendência para o número de bandas reduzir no tecido resistente (excepção MTC-7) e aumentar no tecido susceptível (excepção MTC-2, 8 e 9) quando se comparam o número de bandas no primeiro dia e no sétimo dia de interacção. Para a classe de pesos moleculares entre 205 e 100 kDa, os meios MTC-8 e MTC-5 são aqueles nos quais foram obtidos os valores médios mais elevados e o meio MTC-2 o que apresentou valores médios mais baixos para ambos os tipos de tecido caloso infectado. Em função da CCF sobre o tecido caloso deve-se registar o número de bandas na primeira classe de pesos moleculares, e para a maioria dos meios de cultura, era quase sempre superior para o tecido resistente. Contudo, em algumas interacções, no final do ensaio, quando a cotação do crescimento fúngico era superior, a quantidade de bandas no tecido susceptível superava a do tecido resistente (MTC-2, 4, 5, 7, 8 e 9). Deverá ainda assinalar-se que quando da interacção resulta uma baixa CCF os dois tipos de tecido caloso apresentam comportamentos distintos para o número de bandas entre 205 e 100 kDa: no tecido caloso resistente há um acentuado decréscimo (ver traçado azul escuro dos gráficos referentes a MTC-8 e MTC-9, Fig. 5-20); enquanto que no

tecido caloso susceptível os valores, apesar de inferiores ao do tecido caloso resistente, mantêm-se mais ou menos constantes (ver traçado azul claro dos gráficos referentes a MTC-1 e MTC-6 da mesma figura). As diferenças encontradas entre a média do número de bandas obtida entre 205 e 100 kDa para os dois tipos de tecido caloso eram estatisticamente significativas para os meios MTC-1 e MTC-6 com um valor de p inferior a 0,05 e para o meio MTC-8 com um valor de p inferior a 0,01.

Para a segunda classe de pesos moleculares (60-100 kDa) os valores médios para o tecido resistente variavam de um mínimo de 3,33 (MTC-1) a um máximo de 6,13 bandas (MTC-5), enquanto que para o tecido susceptível variavam de um mínimo de 2,42 (MTC-8) a um máximo de 4,61 bandas (MTC-1). Para o tecido resistente o valor máximo de 10 bandas surgia para o meio MTC-5 no primeiro dia de interacção. Para o tecido susceptível o valor máximo de 7 bandas surgia para o meio MTC-8 no primeiro dia de interacção. O valor mínimo de 1 banda surgia para o tecido resistente para os meios MTC-1, 2, 6 e 9 no sétimo dia de interacção. O valor mínimo para o tecido susceptível com a ocorrência de uma única banda surgiu para o meio MTC-2 igualmente para o sétimo dia de interacção. Pela análise da Fig. 5-21 é possível constatar que o número de bandas na segunda classe de pesos moleculares é sempre superior para o tecido resistente no primeiro dia de interacção. No tecido resistente a tendência, do primeiro para o quarto dia de interacção, é manterem-se ou aumentarem ligeiramente (MTC-1, 2, 4, 7 e 9) ocorrendo em alguns meios decrescimento do número de bandas (MTC-3, 5, 6 e 8). Para o tecido susceptível a tendência, do primeiro para o quarto dia de interacção, é manterem-se ou aumentarem ligeiramente (MTC-6, 7 e 9) ocorrendo em alguns meios decrescimento do número de bandas (MTC-1, 2, 3, 4, 5 e 8). Nos dois tipos de tecido do quarto para o sétimo dia de interacção ocorre sempre decréscimo do número de bandas (sem excepções). Ainda de assinalar que quando da interacção resulta uma baixa CCF os dois tipos de tecido caloso apresentam comportamentos algo distintos para o número de bandas entre 100 e 60 kDa: no tecido caloso resistente há um acentuado decréscimo do quarto para o sétimo dia (ver traçado azul escuro dos gráficos referentes a MTC-8 e MTC-9, Fig. 5-21); enquanto que no tecido caloso susceptível os valores, regista-se um decréscimo módico (ver traçado azul claro dos gráficos referentes a MTC-1 e MTC-6 da mesma figura). Todas as diferenças encontradas entre o tecido resistente e susceptível para o número de bandas nesta classe eram estaticamente significativas, embora as significâncias obtidas tivessem graus distintos, isto é, eram muito significativas para o meio MTC-8 ($p < 0,001$), significativas para MTC-1, MTC-3, MTC-6, MTC-7, MTC-9 ($p < 0,01$) e pouco significativas para MTC-2, MTC-4 e MTC-5 ($p < 0,05$). De sublinhar ainda que para o tecido caloso resistentes esta classe de pesos moleculares é a única onde se registam taxas de decrescimento do número de bandas superiores a 50% para todos os meios de culturas testados. A taxa de decrescimento para o tecido caloso susceptível é muito inferior à do tecido resistente.

No que respeita à terceira classe de pesos moleculares (40-60 kDa) os valores médios para o tecido resistente variavam de um mínimo de 7,17 (MTC-7) a um máximo de 9,97 bandas

(MTC-5), enquanto que para o tecido susceptível variavam de um mínimo de 4,11 (MTC-6) a um máximo de 8,09 bandas (MTC-8). Para o tecido resistente o valor máximo de 13 bandas surgia para os meios MTC-3, 5 e 8 no primeiro dia de interacção. Para o tecido susceptível o valor máximo de 12 bandas surgia para os meios MTC-5 e 8 no primeiro dia de interacção. O valor mínimo de 4 bandas surgia para o tecido resistente para os meios MTC-2, 3, 8 e 9 no sétimo dia de interacção. O valor mínimo de 3 bandas surgia para o tecido susceptível no meio MTC-6 para o sétimo dia de interacção. No tecido resistente a tendência, do primeiro para o quarto dia de interacção, é diminuir o número de bandas em todos os meios testados (excepção MTC-9). Para o tecido susceptível, do primeiro para o quarto dia de interacção, é manterem-se ou diminuir. Nos dois tipos de tecido do quarto para o sétimo dia de interacção ocorre sempre decréscimo do número de bandas com a excepção dos meios MTC-2, 4 e 9, onde aumentam. Pela análise da Fig. 5-22 é possível verificar que para a classe de pesos moleculares entre 60 e 40 kDa em todos os meios de cultura ocorria um decréscimo do número de bandas desde o primeiro até ao último dia de interacção. Os declínios são mais pronunciados para o tecido resistente e sobretudo quando a CCF é menor (MTC-1, 2, 3, 5, 6, 8 e 9, ver traçado azul escuro dos gráficos referentes da Fig. 5-22), contudo no tecido susceptível e nos meios MTC-5 e MTC-8 (ver traçado azul claro dos gráficos referentes da mesma figura). No tecido susceptível os menores declínios do número de bandas para esta classe não estão relacionados com a CCF (menores para MTC-1 e 6 maiores para MTC-2, 4 e 7). As diferenças encontradas para o número de bandas entre os tecidos resistente e susceptível eram estatisticamente significativas, embora com graus diferentes de significância. Todos os meios com a excepção do meio MTC-5 ($p < 0,01$) apresentam diferenças para o número de bandas na terceira classe de pesos moleculares muito significativas ($p < 0,001$).

Quanto à quarta classe de pesos moleculares (13-40 kDa) os valores médios para o tecido resistente variavam de um mínimo de 16,56 (MTC-6) a um máximo de 22,80 bandas (MTC-5), enquanto que para o tecido susceptível variavam de um mínimo de 13,67 (MTC-6) a um máximo de 19,56 bandas (MTC-4). Para o tecido resistente o valor máximo de 32 bandas surgia para o meio MTC-5 no primeiro dia de interacção. Para o tecido susceptível o valor máximo de 27 bandas surgia para o meio MTC-4 no quarto dia de interacção. O valor mínimo de 1 banda surgia para o tecido resistente para os meios MTC-1, 2, 6 e 9 no sétimo dia de interacção. O valor mínimo para o tecido susceptível com a ocorrência de 8 bandas surgiu para o meio MTC-3 igualmente para o sétimo dia de interacção. Pela análise da Fig. 5-23 é possível constatar que o número de bandas na segunda classe de pesos moleculares é sempre superior para o tecido resistente no primeiro dia de interacção. No tecido resistente a tendência, do primeiro para o quarto dia de interacção, é manterem-se ou aumentarem ligeiramente (MTC-1, 2, 4, 7 e 9) ocorrendo em alguns meios decréscimo do número de bandas (MTC-3, 5, 6 e 8). Para o tecido susceptível a tendência, do primeiro para o quarto dia de interacção, é manterem-se ou aumentarem ligeiramente (MTC-6, 7 e 9) ocorrendo em alguns meios decréscimo do número de bandas (MTC-1, 2, 3, 4, 5 e 8). Nos dois tipos de tecido do quarto para o sétimo dia de interacção ocorre sempre decréscimo do

número de bandas (sem excepções). O número de bandas para esta classe de pesos moleculares, e para a maioria dos meios de cultura, é quase sempre superior para o tecido resistente. Contudo, em algumas interacções, a partir do quarto dia, quando a cotação do crescimento fúngico era superior, a quantidade de bandas no tecido susceptível superava a do tecido resistente (MTC-4 e 8). Para o tecido resistente os declínios mais pronunciados do número de bandas ocorreram nos os meios MTC-1, 2, 3, 4, 7 e 8, enquanto que para o tecido susceptível ocorreram nos MTC-3, 7 e 8. No tecido susceptível baixas CCF correspondiam aos menores declínios no número de bandas (MTC-1 e 6). No tecido resistente esta correspondência não era tão directa: para os meios MTC-3 e MTC-8 ocorria uma correspondência com decréscimos acentuados e no meio MTC-9 ocorria uma correspondência com declínios pouco acentuados do número de bandas. As diferenças encontradas para o número de bandas entre o tecido caloso resistente e o tecido caloso susceptível nesta classe de pesos moleculares são estatisticamente muito significativas ($p < 0,001$) para um nível de confiança superior a 99%.

Relativamente à classe de pesos moleculares 5-13 kDa os valores médios para o tecido resistente variavam de um mínimo de 4,83 (MTC-6) a um máximo de 8,44 bandas (MTC-9), enquanto que para o tecido susceptível variavam de um mínimo de 5,22 (MTC-6) a um máximo de 7,50 bandas (MTC-1). Para o tecido resistente o valor máximo de 12 bandas surgia para os meios MTC-2 e 7 no primeiro dia de interacção. Para o tecido susceptível o valor máximo de 12 bandas surgia para o meio MTC-5 no quarto dia de interacção (Fig. 5-24). O valor mínimo de 2 bandas surgia para o tecido resistente no meio MTC-3 para o sétimo dia de interacção. O valor mínimo para o tecido susceptível com a ocorrência de 2 bandas surgiu nos meios MTC-2, 3, 5 e 6 igualmente para o sétimo dia de interacção. É possível constatar que no primeiro dia de interacção os dois tipos de tecido apresentam aproximadamente o mesmo número de bandas na quinta classe de pesos moleculares com duas únicas excepções para os meios MTC 5 e 6. O número de bandas tem tendência para decrescer ao longo do tempo de interacção nos dois tipos de tecido. Contudo, regista-se um comportamento distinto de aumento no número de bandas no tecido resistente, a partir do quarto dia de interacção para os meios MTC-4, 5, 8 e 9. Este comportamento só ocorre no tecido susceptível para o meio MTC-9. No tecido susceptível baixas CCF ao sétimo dia correspondiam a declínios no número de bandas inferiores a 50% (MTC-4 e 8), no meio onde ocorria aumento do número de bandas (MTC-9) a CCF era máxima (5) no último dia de interacção. No tecido resistente dois dos meios (MTC-4 e 5) onde ocorriam aumentos do número de bandas ao sétimo dia correspondiam a valores máximos de CCF (5) e dois meios correspondiam a valores mínimos de CFF (2) no último dia de interacção (MTC-8 e 9). As diferenças encontradas para o número de bandas entre os tecidos resistente e susceptível eram estatisticamente significativas, embora com graus diferentes de significância. Para os meios MTC-1, MTC-4, MTC-6, MTC-8, MTC-9 os valores do número de bandas eram muito significativamente diferentes ($p < 0,001$), para os meios MTC-2, MTC-3 e MTC-5 era moderadamente significativa ($p < 0,01$) e para o meio MTC-7 pouco significativa ($p < 0,05$).

Na presença de *P. cinnamomi*, nas classes de peso molecular analisadas, o número de bandas diminui significativamente e esta diminuição é mais evidente no tecido resistente do que nos susceptível ($p < 0,001$). Duas classes de pesos moleculares contribuem com aumentos do número de bandas (205 a 100 kDa, sobretudo no tecido susceptível e 13 a 5 kDa, sobretudo no tecido resistente), mas todas as outras contribuem com perdas efectivas do número de bandas (perdas sempre superiores a 14%).

Foram estabelecidas correlações positivas entre os pesos moleculares 100 a 40 kDa e o Cl^- e entre os pesos moleculares 40 a 13 kDa e o Mg^{2+} e correlações negativas entre os pesos moleculares 205 a 100 kDa e o oxalato e entre os pesos moleculares 15 a 5 kDa e o K^+ .

Relativamente à análise das componentes principais foram estabelecidas cinco: na primeira componente o números de bandas nas classes de pesos moleculares definidas contribuíram para a explicação do modelo com 98,46%, sendo a ordem decrescente de relevância 60 a 40 kDa, 40 a 13 kDa, 100 a 60 kDa, 205 a 100 kDa e 13 a 5 kDa; na segunda componente as concentrações dos catiões contribuíram para a explicação do modelo com 89,47%, sendo a ordem decrescente de relevância K^+ , Na^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} ; na terceira componente as concentrações dos aniões contribuíram para a explicação do modelo com 85,47%, sendo a ordem decrescente de relevância SO_4^{2-} , Cl^- e HPO_4^{2-} ; na quarta componente a classe de pesos moleculares entre 13 a 5 kDa contribuiu com 52,08% e a concentração em ião HPO_4^{2-} com 9,56% para a explicação do modelo (perfazendo 61,65%); na quinta, e última componente, a concentração em ião oxalato contribuiu com 60,99% e a classe de pesos moleculares entre 40 a 13 kDa com 10,88% para a explicação do modelo (perfazendo 71,87%).

CONCLUSÃO FINAL

A preservação do Bosque Mediterrânico, como ecossistema muito valioso tanto ambientalmente como economicamente, depende da capacidade de controlo dos potenciais factores de declínio bióticos e abióticos, que actuam isoladamente ou em combinação. *Phytophthora cinnamomi* é um fungo patogénico para milhares de espécies de plantas, necrotrófico e pioneiro, que comprovadamente tem contribuído para o declínio deste ecossistema. Este fungo invade muitas espécies da flora natural mediterrânica, incluído *Quercus suber*. Comparativamente a outras espécies de árvores, o sobreiro é considerado razoavelmente resistente a este fungo que é, sobretudo, eficaz no ataque às plantas juvenis. A reposição do sobreiro neste sistema edafoclimático tem-se deparado com grandes dificuldades, tanto por falta de capacidade de regeneração natural desta espécie, como pelo nível de contaminação dos solos por *P. cinnamomi*. A micropropagação vegetativa poderá desempenhar um papel importante na reposição do montado, mormente na introdução de exemplares resistentes ou menos susceptíveis.

A capacidade adaptativa aos climas quentes por *P. cinnamomi* tem concorrido para a vasta dispersão deste agente patogénico pelo nosso planeta. Com a excepção das regiões polares Ártica e Antárctica, a Ásia Continental é a área geográfica menos atingida, enquanto que a Oceânia, a Europa Centro-Occidental e a América do Norte são as mais atingidas pela infestação dos solos por este agente etiológico. No nosso país, é na região algarvia onde a prevalência da doença associada a este fungo no sobreiro é maior. Para além do Algarve, este fungo foi também isolado em estações de Trás-os-Montes, Ribatejo e Alentejo (MOREIRA, 2002).

É nos climas quentes que este fungo se desenvolve em grande escala, e onde existem as condições óptimas para o desenvolvimento do ciclo de esporulação assexuada da “*História de Vida*” de *P. cinnamomi*. A indução de esporângios e consequente libertação de zoósporos móveis

favorecem a contínua dispersão do fungo pelos solos, particularmente, após a estação húmidas.

Não há concordância quanto à melhor forma de combate relativamente a *P. cinnamomi*. As intervenções poderão incluir controlo profilático, tratamento, métodos, biológicos, métodos químicos e métodos mistos. As boas práticas de higiene fitossanitária e a quarentena são universalmente aceites no controlo da dispersão deste agente patogénico.

P. cinnamomi é um agente patogénico altamente destruidor da flora autóctone, cuja detecção e identificação são intrincadas e o controlo e tratamento são muito problemáticos.

Neste estudo foi utilizado o sistema de cultura *in vitro* na tentativa de modelar a interacção entre a espécie vegetal e o fungo patogénico com o objectivo de trazer algum esclarecimento. Numa primeira fase, os esforços ficaram voltados para a indução e manutenção das culturas *in vitro* de *Q. suber* com origem em várias estações de colheita.

No que respeita aos principais resultados de indução e manutenção de culturas *in vitro* verificou-se que a sua rentabilidade duplicava quando em vez de se utilizarem 7 gL⁻¹ de agar se utilizavam apenas 6 gL⁻¹. Este resultado era válido tanto para a obtenção de tecido caloso como de porções aéreas. Foram tentados os meios de cultura de GDMFL e WPMM para a obtenção e manutenção de tecido caloso, de porções aéreas e de plântulas. O melhor meio para a controlar o escurecimento (13,0% vs 28,5%, $p < 0,001$) e para formação de porções aéreas (24,3% vs 9,9%, $p < 0,001$) foi o de GDMFL. Não foram registadas diferenças significativas para a formação de tecido caloso (52,7% vs 51,2%, $p = 0,694$) entre os dois tipos de meio. Ressalvando que existem ligeiras diferenças de composição dos meios de cultura, estes resultados estão globalmente em concordância com os de GOMES (1989) e em discordância com os de ROMANO (1994). A formação de raiz ao fim de 28 dias de cultura não foi registada nem em GDMFL nem em WPMM. A obtenção de plântulas só foi conseguida por método indirecto (GONÇALVES e RAINHO, 1992).

Neste estudo 15% dos explantes contaminaram, 16,9% escureceram, 52,3% formaram tecido caloso, 20,5% formaram porção aérea e nenhum formou raiz ao fim de 28 dias de cultura. Do ponto de vista dos tecidos originais, os que mais contaminaram foram os ápices e os gomos axilares ($p < 0,001$), que como possuem zonas onde a exposição aos agentes desinfectantes é dificultada estão mais sujeitos a contaminações pós inoculação (DODDS e ROBERTS, 1986). Os tecidos originais que mais escureceram foram os ápices, os gomos axilares e os segmentos de entrenó ($p < 0,01$), os que mais formaram tecido caloso foram os segmentos de entrenó e as folhas jovens (intactos ou segmentados) ($p < 0,05$), os que mais formaram porções aéreas foram os gomos axilares e os ápices ($p < 0,001$) e nenhum tipo de explante produziu directamente raízes.

Para a iniciação de culturas *in vitro* de *Quercus suber* propõe-se uma nova abordagem de desinfecção superficial por aplicação de Peróxido de Hidrogénio. A desinfecção de superfícies por Peróxido de Hidrogénio foi comparada com o método clássico (por Hipoclorito de Sódio). O aumento dos tempos de exposição tanto no novo método como no método clássico melhorava a

condição sanitária dos explantes, enquanto que piorava os sinais de escurecimento. No novo método, o aumento da exposição diminuía a formação de tecido caloso e aumentava a produção de porção aérea, enquanto que no método clássico aumentava a formação de tecido caloso e diminuía a produção de porção aérea. Tanto do ponto de vista quantitativo, como qualitativo, o novo método produziu os resultados melhores em termos de indução e manutenção de porções aéreas e de tecido caloso de *Quercus suber in vitro* ($p < 0,001$). Com o novo método os gomos axilares desenvolviam-se mais rapidamente e quase sem aparentarem fenómenos de escurecimento. Com o novo método obtinham-se resultados de desinfecção substancialmente melhores com menores dispêndios de tempo (p. ex. 10 min. era menor tempo experimentado para o novo método e revelou uma contaminação de apenas 11,3%, enquanto que no método clássico o menor tempo, 15 min., revelou uma infecção de 75,6%, $p < 0,001$). Relativamente ao escurecimento a utilização do novo método provou ser igualmente melhor (p. ex. no menor tempo quando foi utilizado o novo método de desinfecção o escurecimento foi de 2,5%, enquanto que no método clássico foi de 36,6%, $p < 0,001$). No que se refere à formação de tecido caloso o novo método de desinfecção, apesar de se mostrar tendencialmente tóxico com o aumento do período de exposição, apresentou, quase sempre, melhores resultados (no menor tempo quando foi utilizado o novo método a formação de tecido caloso foi de 71,3%, enquanto que no método clássico foi de 17,1%, $p < 0,001$). Para a formação de porções aéreas o novo método mostrou ser, quase sempre, melhor que o método clássico (no menor tempo de desinfecção para os dois métodos a percentagem foi sensivelmente igual a zero, no segundo tempo, o novo método revelou uma percentagem de 31,9% e o método clássico de 11,8%, $p < 0,001$). Nem o novo método, nem o método clássico favoreceram o aparecimento de raízes. No estudo em curso a taxa de descontaminação foi sempre superior a 88,8%, que é manifestamente melhor das taxas registados na bibliografia consultada (GOMES, 1989; GONÇALVES e RAINHO, 1992; ROMANO, 1994).

A produção de plântulas de forma indirecta consistia na indução de raízes em porções aéreas (de cerca de 3 cm de comprimento) subcultivadas *in vitro* que eram colocadas em meio contendo 10 mgL^{-1} de IBA durante sete dias, findos os quais eram transferidas e mantidas durante quatro semanas, em meio desprovido de reguladores de crescimento (GONÇALVES e RAINHO, 1992). A formação de raiz por este processo mostrou uma grande variabilidade (consoante o tipo de explante, as percentagens de enraizamento variavam de 28,57% a 66,67%). Esta variabilidade estendia-se, igualmente, ao número de raízes formadas por porção aérea (valor mínimo 1 raiz e valor máximo 6 raízes). A taxa de eficácia de produção de raízes no corrente estudo é muito inferior e muito mais variável do que os resultados apresentados por GONÇALVES e RAINHO (1992) (taxas de 100%) e está mais consonante com os de MANZANERA e PARDOS (1990).

Depois de desinfectados os explantes com pelo método do Peróxido de Hidrogénio (durante 15 min.), estabelecidas as culturas em meio de GDMFL e após terem sido obtidas as quantidades suficientes de material vegetal sucedeu-se a infecção das culturas com as duas estirpes disponíveis de *P. cinnamomi*. Para produzir porções aéreas recorreu-se apenas a gomos

axilares. Para produzir tecido caloso recorreu-se a segmentos de entrenó intactos (sem corte longitudinal). O material com origem em folhas não foi utilizado nos testes de patogenicidade e resistência. As porções aéreas subcultivadas com ou sem indução de raiz foram utilizadas para infecção e avaliação da patogenicidade. O tecido caloso foi utilizado nos testes de resistência/susceptibilidade.

O processo de infecção escolhido passava pela optimização do processo de esporulação e zoosporogénese. Foram comparados os métodos de esporulação assexuada de BYRT e GRANT (1970) e de CHAMBERS *et al.* (1995) em duas estirpes de *P. cinnamomi*, designadamente: IMI 077375 obtida por compra ao International Mycological Institute (isolado em França em 1991, a partir de *Castanea sativa*, tipo de acasalamento A2) e H1000 (DAR 52646, ATCC 200982, originalmente isolado a partir de uma amostra de solo colhida em Brisbane Ranges, Vitória, Austrália) ofertada pela Dra. Adrienne Hardham. As duas estirpes, nas mesmas condições culturais, apresentavam crescimentos diferenciados (IMI 077375 apresentava uma taxa de crescimento de cerca de metade da de H1000). As restantes características morfológicas (como as dimensões das hifas, dos esporângios, dos zoósporos ou dos clamidósporos) eram muito semelhantes. As principais diferenças registadas foram no crescimento do micélio vegetativo, na morfologia da colónia e na quantidade de zoósporos libertados. A quantificação do número de zoósporos produzidos em cada um dos métodos testados foi obtida técnica do Número Mais Provável e revelou diferenças assinaláveis, designadamente: o método de CHAMBERS *et al.* (1995) foi o mais produtivo para ambas as estirpes (48 vezes mais zoósporos para a estirpe H1000 e 15 vezes mais zoósporos para a estirpe IMI 077375, $p < 0,001$); H1000 foi a estirpe mais produtiva em ambos os métodos testados [no método de CHAMBERS *et al.* (1995) produzia 17 vezes mais zoósporos e no método de BYRT e GRANT (1979) produzia 5 vezes mais zoósporos, $p < 0,001$]. Estes resultados obtidos estão de concordância com os de CHAMBERS *et al.* (1995), que obtiveram suspensões de 10^4 zoósporos por mL e em discordância com os de BYRT e GRANT (1979) que obtiveram suspensões de 10^5 zoósporos por mL.

No estudo da patogenicidade de *P. cinnamomi* sobre *Q. suber* procurou-se estabelecer o tipo de relação presente: relação de compatibilidade (susceptibilidade); ou de incompatibilidade (resistência). Infectaram-se plântulas e porções aéreas, de *Q. suber* mantidas *in vitro*. Estes testes foram executados com as duas estirpes e obtiveram-se quadros sintomatológicos de infecção em tudo semelhantes ao que sucede em estudos acerca da interacção entre estas duas espécies *in vitro* ou *in vivo*. Os sintomas incluíam o aparecimento de micélio visível a crescer sobre o tecido vegetal, as raízes deixavam de crescer, passavam de branco-amareladas para castanho-escuro, aparecimento de necrose ao nível do primeiro nó que, em alguns casos, prosseguia até ao ápice, aparecimento de manchas necróticas cuneiformes nas folhas, aparecimento de manchas necróticas mais ou menos dispersas pela folha (semelhante à sintomatologia relacionada com a escassez hídrica). Em resumo a estirpe H1000 é mais virulenta que IMI 077375, isto é, possui a capacidade de provocar um quadro sintomatológico pior (maior percentagem de plântulas com

cada um dos sintomas). O sintoma que surge mais precocemente é a interrupção do crescimento radicular. Todos os outros sintomas começam a surgir para a estirpe H1000 a partir do segundo dia e para a estirpe IMI 077375 a partir do terceiro dia após a inoculação. Todos os sintomas estão presentes a partir do quarto dia independentemente das plântulas terem sido infectadas com a estirpe H1000 ou com a estirpe IMI 077375. Até ao sétimo dia o quadro sintomatológico vai piorando, progressivamente, e com mais impetuosidade para a estirpe H1000. Os tecidos de *Q. suber* utilizados nos ensaios de infecção foram testados de forma a promover o re-isolamento do fungo a partir de cada órgão das plântulas (raízes, base caulinar, primeiro nó, segundo nó e ápice). O teste revelou-se positivo para todas as partes excisadas das plântulas submetidas ao ensaio na presença do fungo ao fim de sete dias de interacção. Salvaguardando que existem diferenças metodológicas, estes resultados estão em clara contradição com os de MONIZ *et al.* (1996) e em concordância com os de CHAMBERS *et al.* (1995) para plântulas micropropagadas de *Castanea sativa*. Para este sistema a morte da plântula surgia ao quarto dia (CHAMBERS *et al.*, 1995) enquanto que para *Q. suber* surgia ao sétimo dia (a morte da planta, com o sistema radicular e a porção caulinar totalmente necróticos, para as duas estirpes estudadas). Como resultado desta comparação pode dizer-se que *Castanea sativa* é mais susceptível que *Q. suber*.

Nos ensaios ao tecido caloso, infectaram-se as culturas com 10 µL de suspensões de zoósporos de *P. cinnamomi* e foram mantidas ao longo de sete dias. Sobre os tecidos calosos foram obtidas cotações do crescimento fúngico distintas para os diferentes clones de *Quercus suber* disponíveis. Não foram observados clones verdadeiramente resistentes, ou seja, nenhum dos clones testados apresentava uma cotação de crescimento fúngico de 0 (pelo método descrito por HELGESON *et al.*, 1972). Em vez disso, obtiveram-se gradações de crescimento fúngico, nomeadamente: clones que ficavam totalmente envoltos por um tapete micelial; clones que apresentavam um escurecimento parcial e pouco micélio aéreo; clones com escurecimento completo e pouco micélio aéreo. Estas diferenças eram devidas à morfologia e textura dos tecidos, isto é, os tecidos menos densos, mais humedecidos eram os mais intensamente colonizados (tecido caloso completamente envolto por uma manta micelial) e aqueles menos colonizados possuíam uma aparência firme e seca (clones que apresentavam um escurecimento total ou parcial e algum ou pouco micélio aéreo). O desenho experimental subsequente foi desenrolado tendo em conta os seguintes critérios de inclusão para a triagem dos clones disponíveis: tecidos que crescem rapidamente e homoganeamente (ao fim de 4 semanas de crescimento a totalidade da superfície de agar teria de estar homoganeamente recoberta); e tecidos que possuem uma consistência friável, densa e não demasiadamente compacta (tipo firme e seco). Em função destes critérios excluíram-se a totalidade dos clones de Trás-os-Montes, os clones de natureza adulta (cuja consistência dos tecidos calosos era compacta e o crescimento lento e não homogéneo) e os clones de Aveiro. Os clones eleitos foram o clone 702 e 484, provenientes de Montemor-o-Novo e de Ponte-de-Sôr, respectivamente. Estes dois tecidos eram de textura comparável, condição indispensável de acordo com McCOMB *et al.* (1987) para comparar o comportamento do

crescimento fúngico sobre o tecido caloso de diferentes clones. A aparência dos tecidos 702 e 484 era muito semelhante. No entanto o incremento do peso fresco do tecido caloso dos dois clones a crescerem em nove meios de cultura diferentes no que respeita aos reguladores de crescimento era significativamente diferente [a prova de Kruskal–Wallis do incremento do peso fresco do tecido em função do tipo de clone resultou muito significativa ($p < 0,001$) e em função do meio de cultura resultou pouco significativa ($p = 0,045$)]. A concentração em reguladores de crescimento no meio de cultura contribuía para uma alteração volume de tecido produzido (o clone 702 era mais produtivo que o clone 484), sem que as características morfológicas fossem alteradas (os tecidos mantinham as suas características de crescimento rápido, ao fim de 4 semanas a totalidade da superfície de agar estava homogeneamente recoberta, possuíam uma consistência friável, densa e não demasiadamente compacta e apresentavam-se com uma aparência seca).

Nos ensaios de resistência e de susceptibilidade ao agente etiológico *P. cinnamomi*, os dois clones seleccionados foram sujeitos a infecção com 10 μ L de suspensão de zoósporos da estirpe H1000. Foram obtidas diferentes cotações do crescimento fúngico sobre o tecido caloso no decorrer dos sete dias de incubação. O clone que aparentava uma pior sintomatologia de infecção foi o 484: a cotação do crescimento fúngico sobre o tecido caloso deste clone, ao fim dos sete dias, era máxima o que não acontecia com o clone 702; ao longo do tempo a cotação do crescimento fúngico para o clone 702 era cerca de metade da do clone 484, com a excepção dos dois últimos dias. Apesar de nenhum dos clones aparentar uma verdadeira resistência o clone 702 passou a ser designado por clone resistente, enquanto que o 484 passou a ser designado por clone susceptível. Os acontecimentos que ocorriam durante os sete dias de incubação podem ser descritos da seguinte forma: no tecido resistente havia uma limitação do crescimento micelial, um escurecimento parcial progressivo, a quantidade de micélio visível era menor e nunca atingia o limite do clone; no clone susceptível os sintomas de infecção eram agravados, o micélio era mais denso e atingia o limite do clone, mais precocemente era observável o escurecimento progressivo do tecido. Estes resultados são comparáveis aos de McCOMB *et al.* (1987), nos quais a resposta hipersensível era caracterizada pela alteração de cor para vermelho-acastanhada na vizinhança imediata da localização das hifas, a resistência era detectada por crescimento limitado e esparso sobre o tecido caloso, em contraste com o crescimento prolífico e aéreo registado no meio de cultura ou sobre o tecido caloso susceptível.

Da análise dos aspectos ultrastruturais da interacção entre os dois clones (484 e 702) e *P. cinnamomi* foi difícil verificar quão diferentes eram as duas respostas. As diferenças reflectiram-se mais ao nível do número de células que denotavam perturbações quando na presença do agente infeccioso (maior perturbação para 484 do que para 702). Quanto mais próximo se estava da origem da inoculação tanto maior era o grau de desorganização celular. Pode concluir-se que para todas as zonas de amostragem em situação de interacção com o agente infeccioso, ocorria perda de turgescência das células e colapso das células do tecido caloso. A acumulação de materiais contrastantes na microscopia electrónica de transmissão do tipo granulares, lenticulares e

globulares (electrondensos), sobretudo no espaço intracelular (por vezes ao nível do vacúolo) do hospedeiro indicavam necrose. Não foi possível registar uma diferença tão marcada entre o tecido resistente e o susceptível como no caso dos estudos de JANG e TAINTER (1990). Para o sistema *Q. suber* – *P. cinnamomi* também parecia evidente a prevalência dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos sobre os físicos.

Neste trabalho foi testada a importância da variação da composição em reguladores de crescimento no desenrolar da interacção *P. cinnamomi*-*Q. suber*. Foram utilizados nove meios de cultura, cuja composição variava no que se refere às concentrações em reguladores de crescimento com o objectivo de verificar se diferentes rácios entre auxina e citocinina podiam ou não induzir resistência/susceptibilidade nos clones ensaiados. Mais uma vez, para a cotação do crescimento fúngico recorreu-se à escala de HELGESON *et al.* (1972).

O comportamento do tecido era claramente influenciado pelo teor em reguladores de crescimento. Nos meios MTC-4 e MTC-7, onde a proporção em auxina e citocinina era de 5,37:2,22 μM e de 5,37:4,44, respectivamente, ambos os tecidos passaram a ter uma reacção de grande susceptibilidade ao fungo. No meio MTC-2, onde a proporção entre auxina e citocinina era de 10,74:0,44 μM a reacção de resistência era apresentada por ambos os tecidos. O mesmo acontecia no meio MTC-6 (10,74:2,22 μM), embora aqui o clone 484 apresentasse uma maior resistência do que 702. No meio MTC-1 (5,37:0,44 μM) o clone 484 (designado por susceptível) passa a apresentar uma reacção de grande resistência, enquanto que o 702 (designado por resistente) passa a apresentar uma reacção de susceptibilidade. Nos restantes meios (MTC-2, MTC-5, MTC-8 e MTC-9, com as proporções de: 8,06:0,44; 8,06:2,22; 8,06:4,44 e 10,74:4,44 μM , respectivamente) o tecido 484 apresentava a reacção de susceptibilidade que o caracterizava, assim como 702 a de resistência. O comportamento do tecido resistente era mais homogéneo que o do tecido susceptível, isto é, nos nove meios testados apenas em três situações modificou a reacção que o caracterizava, o que aconteceu sempre que foi utilizada a mais baixa concentração em auxina. O aumento da concentração em citocinina, no tecido susceptível, piorava o quadro de infecção, passando de tecido resistente para tecido susceptível ou muito susceptível. O aumento da concentração em auxina apenas atenuava o efeito do aumento da citocinina. No tecido resistente apenas quando a concentração em auxina é mínima é que a citocinina possui um efeito de aumento da sintomatologia de infecção. Também para este tecido, o aumento da concentração da auxina parece atenuar os efeitos produzidos pela citocinina. Estes resultados são comparáveis aos de HABERLACH *et al.* (1978) na interacção de tecido caloso resistente de *Nicotiana tabacum* com zoósporos de *Phytophthora parasitica*. A concentração em citocininas necessária para que o tecido caloso de *Q. suber* é muito superior à presente no estudo de HABERLACH *et al.* (1978). No estudo citado quando a proporção entre a auxina e a citocinina era de 1:1 surgia uma reacção de susceptibilidade, já em *Q. suber* esta reacção surgia quando a relação era de 2:1 para o tecido susceptível (clone 484) e de 1:1 para o tecido resistente (clone 702). A susceptibilidade máxima no tecido susceptível surgia para balanços de 8,06 μM de NAA e 4,44 μM de BAP ou de 10,74 μM de

NAA e 4,44 μM de BAP e do tecido resistente era de 5,37 μM de NAA e 2,22 μM de BAP ou de 5,37 μM de NAA e 4,44 μM de BAP no sistema *P. parasitica*-*N. tabacum* a maior susceptibilidade surgia para balanços de 10 μM de K e de 10 μM de IAA ou de 10 μM de K e de 11,5 μM de IAA. Para HABERLACH *et al.* (1978) a adição de citocinina (K) eliminava o efeito da resposta hipersensível e diminuía drasticamente a resistência do tecido caloso. Igualmente, para o tecido caloso susceptível de *Q. suber* o aumento de citocinina (BAP) a cotação do crescimento fúngico era aumentada, aparentando, os tecidos, uma reacção de maior susceptibilidade. E a diminuição de citocinina acelerava o efeito da resposta hipersensível como também aumentava, de forma assinalável, a resistência sobretudo para o tecido susceptível. Já no tecido resistente a resposta parece ser contrária, isto é, baixas concentrações de citocinina produzem respostas de maior resistência e concentrações elevadas de citocinina respostas de maior susceptibilidade. Em termos absolutos, o tecido caloso susceptível quando incubado nos meios MTC-1, MTC-3 e MTC-6, produzia os melhores resultados de resistência.

A aplicação da técnica da electroforese capilar de iões forneceu dados relativos às concentrações de NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , NO_2^- , HPO_4^{2-} , F^- e ião oxalato nos tecidos desafiados pelo fungo. As concentrações destes iões foram analisadas de acordo com o Tipo de Clone (resistente ou susceptível), Tipo de Ensaio (presença ou ausência de zoósporos de *P. cinnamomi*), Tipo de Meio (MTC-1 a MTC-9) e Número de Dias de Incubação (1 a 7 dias).

Relativamente ao catião NH_4^+ notavam-se concentrações superiores para o tecido resistente, enquanto que o tecido susceptível apresentava quantidades vestigiais. No sétimo dia de interacção a quantidade deste ião no tecido resistente baixava para níveis vestigiais. Não foi encontrada uma relação entre a concentração de NH_4^+ e a reacção de resistência/susceptibilidade apresentada pelo tecido. Contudo são claras as diferenças encontradas entre o tecido caloso susceptível e resistente. Para este catião o factor mais importante parece ser o tipo de tecido caloso (resistente ou susceptível).

A concentração do catião K^+ para o tecido resistente e susceptível revelou-se significativamente diferente tendo em conta todos os meios testados. Há um aparente sincronismo entre a concentração deste catião no tecido caloso susceptível e resistente e uma tendência de diminuição da sua concentração do primeiro para o último dia de interacção. Para este catião o factor mais importante parece ser o tipo de meio de cultura (MTC-1 a MTC-9).

A concentração do catião Ca^{2+} para o tecido resistente e susceptível revelou-se significativamente diferente tendo em conta todos os meios testados. Há uma aparente simultaneidade entre a concentração deste catião no tecido caloso susceptível e resistente e uma tendência de diminuição da sua concentração do primeiro para o último dia de interacção. Para este catião o factor mais importante parece ser o tipo de meio de cultura (MTC-1 a MTC-9).

A concentração em Na^+ para o tecido resistente e susceptível revelou-se significativamente diferente tendo em conta todos os meios testados. Há uma aparente sintonia

entre a concentração deste catião no tecido caloso susceptível e resistente e uma tendência de diminuição da sua concentração do primeiro para o último dia de interacção (excepção para MTC-4, MTC-6 e MTC-8). Para este catião o factor mais importante parece ser o tipo de meio de cultura (MTC-1 a MTC-9).

A concentração em Mg^{2+} para o tecido resistente e susceptível revelou-se significativamente diferente tendo em conta todos os meios testados. Há uma aparente sintonia entre a concentração deste catião no tecido caloso susceptível e resistente e uma tendência de manutenção da sua concentração do primeiro para o último dia de interacção (excepção para MTC-1, MTC-5 e MTC-9). Para este catião o factor mais importante parece ser o tipo de meio de cultura (MTC-1 a MTC-9).

As quantidades de ião NH_4^+ são vestigiais, ou tendencialmente vestigiais na presença do agente etiológico e variam mais significativamente de acordo com o tipo de clone (resistente ou susceptível). Os catiões K^+ , Ca^{2+} e Na^+ diminuem globalmente na presença do agente patogénico e variam mais significativamente de acordo com o tipo de meio. O catião Mg^{2+} é aquele que não parece ser afectado pela presença de *P. cinnamomi*, isto é, na maioria dos meios testados quase não ocorria variação da sua concentração (as maiores variações foram encontradas nos meios MTC-1, MTC-5 e MTC-9, onde ocorreram declínios acentuados). No sistema *P. cinnamomi*-*Q. suber* os catiões K^+ , Ca^{2+} e Na^+ aparentam ser os mais implicados nos mecanismos de resistência e susceptibilidade e a sua diminuição deverá estar relacionada com a morte celular provocada pela presença do agente etiológico (fungo necrotrófico).

A concentração em Cl^- para o tecido resistente e susceptível revelou-se significativamente diferente tendo em conta todos os meios testados. Para o tecido susceptível há uma tendência de manutenção da concentração deste anião do primeiro até ao último dia de interacção. Para o tecido resistente a concentração deste anião, do primeiro até ao último dia de interacção, diminui tendencialmente. A concentração em Cl^- é sempre superior no tecido susceptível.

Relativamente ao anião NO_2^- notavam-se concentrações vestigiais para a maioria dos ensaios. Apenas ocasionalmente (cotações de crescimento fúngico de 0, 1, 2 e 3) ocorrem concentrações mais elevadas deste anião não se verificando qualquer relação em função do tipo de clone, do tipo de reacção ou do tipo de meio. Notar que no final da interacção a concentração em NO_2^- ou são nulas ou vestigiais.

A concentração de SO_4^{2-} para o tecido resistente e susceptível revelou-se significativamente diferente tendo em conta todos os meios testados. Para o tecido susceptível há uma tendência de manutenção da concentração deste anião do primeiro até ao último dia de interacção e para o tecido resistente a concentração diminui tendencialmente. No primeiro dia de interacção a concentração em SO_4^{2-} é sempre superior para o tecido resistente e no último dia a concentração é sempre superior para tecido susceptível.

Relativamente ao anião NO_3^- notavam-se concentrações vestigiais para a maioria dos

ensaios. Apenas ocasionalmente ocorrem concentrações mais elevadas deste anião não se verificando qualquer relação em função do tipo de clone, do tipo de reacção ou do tipo de meio. Notar que no final da interacção a concentração em NO_3^- ou são nulas ou vestigiais (excepção MTC-4).

A concentração em oxalato é muito variável de acordo com o tipo de tecido e o tipo de meio. Não se encontrou uma relação entre a cotação do crescimento fúngico e a variação da concentração deste ião. Nos meios MTC-2, MTC-4 e MTC-7 o tecido resistente possui uma concentração em oxalato no sétimo dia de interacção superior à do primeiro dia. Isto poderá ser explicado, provavelmente, pela capacidade deste tecido contrariar a tendência da libertação das enzimas citosólicas que reduzem o nível do ácido oxálico (acidificação do meio envolvente para impedir o desenvolvimento do fungo) (TANNER e BORNEMANN, 2000). Este efeito ocorre no meio MTC-3 para o tecido susceptível que apresenta uma reacção de resistência nestas circunstância. No sétimo dia e em todos os outros meio, o tecido susceptível apresenta sempre uma concentração baixa em oxalato. De assinalar que, tanto num tecido resistente como no susceptível, quando se regista uma resposta de maior resistência, a tendência é de diminuição da concentração em oxalato. Para este ião as diferenças encontradas são estatisticamente significativas em todos os meios de cultura ($p < 0,01$).

Relativamente ao anião F^- notavam-se concentrações vestigiais para a maioria dos ensaios. Apenas ocasionalmente (MTC-5) ocorrem concentrações mais elevadas deste anião não se verificando qualquer relação em função do tipo de clone, do tipo de reacção ou do tipo de meio. Notar que no final da interacção a concentração em F^- ou são nulas ou vestigiais.

A concentração em HPO_4^{2-} para o tecido resistente e susceptível revelou-se significativamente diferente tendo em conta todos os meios testados. Para o tecido susceptível há uma variação de padrão de concentração (do primeiro até ao último dia de interacção a concentração mantém-se, aumenta ou diminui) e para o tecido resistente a concentração mantém-se, tendencialmente. No primeiro dia de interacção a concentração em HPO_4^{2-} é sempre superior para o tecido susceptível.

As quantidades dos iões NO_2^- , NO_3^- e F^- são vestigiais, ou tendencialmente vestigiais na presença do agente etiológico e não se verifica qualquer relação em função do tipo de clone, do tipo de reacção ou do tipo de meio. Para o tecido resistente os aniões Cl^- e SO_4^{2-} diminuem globalmente na presença do agente patogénico e para o tecido susceptível mantém-se genericamente do primeiro ao último dia de interacção. Para o tecido resistente o anião HPO_4^{2-} mantém-se globalmente na presença do agente patogénico e para o tecido susceptível diminui genericamente do primeiro ao último dia de interacção. O ião oxalato é aquele que apresenta um padrão de variação maior, no entanto deverá sublinhar-se que por vezes o tecido resistente e o tecido susceptível (quando denunciam reacções de resistência) apresentam aumentos da concentração deste ião ao sétimo dia de interacção. Esta tendência dever-se-á à tentativa dos

tecidos impedirem a progressão do fungo por aumento da acidificação do meio envolvente segundo TANNER e BORNEMANN (2000).

A análise das correlações canónicas revelou a existência de quatro raízes canónicas com uma relação significativa ($p < 0,001$) entre 12 iões e as variáveis independentes (*Tipo de Clone*, *Tipo de Meio* e *Cotação do Crescimento Fúngico*). A primeira raiz canónica explica 59,0% da variância, a segunda raiz 22,6%, a terceira raiz 7,6% e a quarta raiz 5,8% da variância total. A leitura destes resultados permite concluir, globalmente, que as variáveis independentes possuem um efeito significativo na concentração dos 12 iões. Mormente, as variáveis *Tipo de Clone* e *Cotação do Crescimento Fúngico* (as variáveis independentes com maior impacto) possuem um efeito muito significativo, sobretudo, na concentração dos iões Cl^- e SO_4^{2-} .

No estudo dos perfis proteicos dos tecidos em interacção com o agente etiológico *P. cinnamomi* os perfis proteicos foram divididos em cinco classes de pesos moleculares: primeira 205-100 kDa; segunda 100-60 kDa; terceira 60-40 kDa; quarta 40-13 kDa e quinta 13-5 kDa. Para os dois tipos de tecido caloso infectado a classe mais representada é a quarta e as menos representadas eram a primeira e a segunda. Para os dois tecidos a quarta classe de pesos moleculares é a mais representada, enquanto que as menos representadas são a primeira e a segunda classe. A terceira e a quinta classe de pesos moleculares constituem as classes diferentemente representadas para os dois tipos de tecidos calosos infectados.

Na presença de *P. cinnamomi* a quantidade total de bandas é sempre superior para o tecido resistente infectado. Por outro lado para os dois tipos de tecido verifica-se que ao longo do tempo de interacção, e em todos os meios testados, há um declínio do número total de bandas. As diferenças encontradas para a quantificação do número total de bandas são estatisticamente muito significativas ($p < 0,001$) para um nível de confiança superior a 99%.

Quando calculada a taxa de decréscimo do número de bandas totais verificou-se que o meio para o qual houve menor percentagem de perda de banda foi aquele onde a concentração em auxina e citocinina eram máximas (10,74:4,44 μM), tanto para o tecido caloso susceptível como para o resistente. Curiosamente naquele onde ocorreram maiores perdas (MTC-3), ambos os tecidos apresentavam uma resposta de resistência.

A primeira e a última classes de pesos moleculares foram as únicas onde, em vez de diminuição, se registou aumento do número de bandas para alguns meios.

Para a classe de pesos moleculares entre 205 e 100 kDa, e para o tecido resistente pode assinalar-se que, globalmente houve declínio do número de bandas (excepção para MTC-7, 5,37:4,44 μM , reacção de grande susceptibilidade). Para o tecido susceptível foi registada perda do número de bandas para os meios MTC-2, MTC-8 e MTC-9, manutenção para os meios MTC-6 e MTC-4 e aumento para os meios MTC-1, MTC-3, MTC-5 e MTC-7. As diferenças de quantidade de bandas para esta classe de pesos moleculares foram mais assinalável para MTC-1, MTC-6 e MTC-8.

Para a segunda classe de pesos moleculares (60-100 kDa) o tecido resistente é aquele onde há mais bandas e onde são registadas maiores perdas de bandas, genericamente, para todos os meios de cultura ($p < 0,05$). De registar que para o tecido susceptível os meios MTC-1 e MTC-6 são aqueles onde são registados os menores declínios do número de bandas, de forma coincidente, nestes meios o tecido apresenta uma reacção de grande resistência.

No que respeita à terceira classe de pesos moleculares (40-60 kDa), globalmente, continuam-se a registar maiores perdas do número de bandas para o tecido resistente, apesar de neste, o número de bandas ser maior do que no tecido susceptível. As diferenças encontradas para o número de bandas entre os tecidos resistente e susceptível eram estatisticamente significativas, embora com graus diferentes de significância. Todos os meios com a excepção do meio MTC-5 ($p < 0,01$) apresentam diferenças para o número de bandas na terceira classe de pesos moleculares muito significativas ($p < 0,001$).

No que respeita à terceira classe de pesos moleculares (13-40 kDa), globalmente, continuam-se a registar maiores perdas do número de bandas para o tecido resistente, apesar de neste, o número de bandas ser maior do que no tecido susceptível. As diferenças encontradas para o número de bandas entre os tecidos resistente e susceptível eram estatisticamente muito significativas ($p < 0,001$).

Para a classe de pesos moleculares entre 5 e 13 kDa, e para o tecido susceptível pode assinalar-se que, globalmente houve declínio do número de bandas (excepção para MTC-9, 10,74:4,44 μ M, reacção de grande susceptibilidade). Para o tecido resistente foi registada perda do número de bandas para os meios MTC-1, MTC-2, MTC-3 e MTC-7, manutenção para o meio MTC-6 e aumento para os meios MTC-4, MTC-5, MTC-8 e MTC-9. As diferenças de quantidade de bandas para esta classe de pesos moleculares foram mais assinalável para MTC-1, MTC-6 e MTC-8. Para os meios MTC-1, MTC-4, MTC-6, MTC-8, MTC-9 os valores do número de bandas eram muito significativamente diferentes ($p < 0,001$), para os meios MTC-2, MTC-3 e MTC-5 era moderadamente significativa ($p < 0,01$) e para o meio MTC-7 pouco significativa ($p < 0,05$).

Em resumo nas classes de pesos moleculares marginais (primeira e última) os tecidos resistente e susceptível em vez de apresentarem diminuição do número de bandas, apresentam aumentos. Para o tecido susceptível os ganhos são mais frequentes na primeira classe de pesos moleculares e para o tecido resistente na última. Nas classes de pesos moleculares intermédias (segunda, terceira e quarta) o número de bandas é sempre superior no tecido resistente e este é o que apresenta maiores perdas. De assinalar que na classe 60-100 kDa, quando o tecido caloso susceptível apresenta uma reacção de grande resistência, o declínio é menos acentuado. Estes acontecimentos podem ser devidos à síntese de proteínas relacionadas com a patogénese por parte do hospedeiro, como seja a aldolase da fructose-1,6-bifosfato (50 kDa, EC 4.1.2.13) (TURCO *et al.*, 2004). A beta-cinamonina é uma proteína indutora de sinal, tóxica, que provoca a morte celular, com 10 kDa de peso molecular e que é libertada em quantidades consideráveis por

P. cinnamomi (RODRIGUES *et al.*, 2002). Aparentemente na quinta classe de pesos moleculares poderá ocorrer o contributo destes peptídeos para o aumento do número de bandas nos meios MTC-4, MTC-5, MTC-8 e MTC-9 para o tecido resistente. As poligalacturonases (PGs, EC 3.2.1.15, 54-35 kDa) são segregadas pelos agentes patogénicos fúngicos (nomeadamente por *P. cinnamomi*) durante o crescimento saprofítico e parasítico, e pensa-se que a sua degradação da pectina na parede celular do hospedeiro desempenhe um papel fundamental na invasão dos tecidos e na maceração (GÖTESSON *et al.*, 2002). No corrente estudo, não foram encontradas evidências para o envolvimento de proteínas com pesos entre 54 e 35 kDa, em vez disso, parece ocorrer o envolvimento de um ou mais peptídeos com peso molecular entre 60 e 100 kDa.

Correlacionando o número de bandas dos perfis peptídicos com as concentrações em iões foram obtidas três correlações positivas (Mg^{2+} - 40 a 13 kDa; Cl^- - 100 a 60 kDa e Cl^- - 60 a 40 kDa) e duas negativas (K^+ - 13 a 5 kDa e Oxalato - 205 a 100 kDa). Os aniões parecem estar mais directamente relacionados com as classes de maior peso molecular, enquanto que os catiões parecem estar relacionados com as classes de menor peso molecular.

Na análise de componentes principais para o sistema *Q. suber-P.cinnamomi* foram atribuídas relevâncias ao número de bandas nas classes de pesos moleculares (a maior relevância foi atribuída à classe entre 60 a 40 kDa, seguida de 40 a 13 kDa, 100 a 60 kDa, 205 a 100 kDa e 13 a 5 kDa), aos catiões (a maior relevância foi atribuída ao K^+ , seguido pelo Na^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+}) e aos aniões (a maior relevância foi atribuída ao SO_4^{2-} , seguido pelo Cl^- e HPO_4^{2-}). De salientar ainda a quarta e quinta componentes principais que destacaram a classe de pesos moleculares entre 13 a 5 kDa e a concentração em ião oxalato (com contributos com para a explicação em cada um dos modelos de 52,08% e 60,99%, respectivamente).

Após se ter apresentado a análise integradora dos principais resultados obtidos em cada capítulo do trabalho escrito, impõe-se um desfecho.

É certo que esta análise da relação *in vitro* entre o agente patogénico *P. cinnamomi* e o hospedeiro *Q. suber* não tem a pretensão de esgotar o tema e, muito menos, de apresentar postulados aplicáveis a esta relação *ex vitro*. Seguramente ficaram por esclarecer muitas dúvidas relativas aos mecanismos envolvidos neste sistema e não foram abordados muitas temáticas relacionadas com esta área de estudo. A tarefa de esgotar este tema, seria impossível de realizar por razões que se prendem com a variedade de mecanismos envolvidos, os diferentes comportamentos das estirpes de *P. cinnamomi* existentes, os diferentes comportamentos de resistência e susceptibilidades apresentados pelos clones de sobreiro, entre outros.

O plano de estudo traçado, foi seguido, na medida do possível, e o resultado final poderá ser entendido como circunscrito, mas poderá traçar novos percursos pessoais ou, idealmente, poderá permitir percursos próprios a outros investigadores. As conclusões aqui apresentadas mais do que fecharem as questões levantadas abrem novas perspectivas que talvez inspirem novas questões para trabalhos futuros. Subsequentemente, poderão surgir abordagens do tema

descoincidentes ou mesmo distintas que, naturalmente, contribuirão para um maior aprofundamento do conhecimento desta interacção.

Este trabalho contribuiu, ainda que de forma peculiar ou indirecta, com alguns esclarecimentos para as alterações que ocorrem em *Q. suber* quando sujeito à invasão por *P. cinnamomi*. Por fim, é exequível articular melhor a resposta à questão de como será a relação *in vitro* entre *Quercus suber* e *Phytophthora cinnamomi*.

Agora que se ultima o texto da dissertação surge a vontade incontornável de retomar o estudo, declaradamente não nos mesmos moldes, mas no sentido de o reforçar com contributos no domínio de determinações relacionadas com o jasmotato, isolamento e identificação de proteínas relacionadas com a patogénese (produzidas por *Q. suber*, p. ex. aldolase) e de proteínas indutoras de sinal (produzidas por *P. cinnamomi*, p. ex. beta-cinamonina) na interacção *in vitro*, bem como, dos genes envolvidos nos mecanismos de indução de sinal e de defesa.

Esta foi uma experiência enriquecedora na forma de uma valorização proporcionada pela aquisição de novos conhecimentos e competências na área fitopatologia, da bio-estatística, da bio-informática, no domínio técnico de aprendizagens relacionadas com as culturas *in vitro*, co-culturas, zoosporogénese, electroforese capilar e microscopia electrónica que contribuíram em sùmula para o acréscimo de capacidades de investigação e de docência da autora.

BIBLIOGRAFIA

- ALEXOPOULOS, C.J., MIMS, C.W. e BLACKWELL, M. (1996).** *Introductory mycology* (4ª Edição). New York, John Wiley & Sons, Inc. Pág. 61-87. ISBN: 0471522295.
- AUGÉ, R. (1989).** Les phénomènes physiologiques liés a la réalisation *in vitro*. In: *La Culture In Vitro et ses Applications Horticoles* (Editado por R. Augé, G. Beauchesne, J. Boccon-Gibod, L. Decourtye, B. Digat, R. Jalouzot, R. Minier, J.-Cl. Morand, J.P. Reynoird, D.G. Strullu, H. Vidalie) (3ª edição revista , corrigida e aumentada). Technique et Documentation-Levoisier, J.B. Baillière. Paris. ISBN: 2-85206-504-5.
- AUGÉ, R.; BEAUCHESNE, G.; BOCCON-GIBOD, J.; DECOURTYE, L.; DIGAT, B.; JALOUZOT, R.; MINIER, R.; MONARD, J.-Cl.; REYNOIRD, J.P.; STRULLU, D.G.; VIDALIE, H. (1989).** *La culture "in vitro" et ses applications horticoles*. Technique et Documentation-Levoisier, J.B. Baillière. Paris.
- BAETA NEVES, C.M. (1948).** A “Investigação Científica” e os Problemas da “Protecção” do Sobreiro. *Boletim da Junta Nacional da Cortiça X*, **116**: 386-389. Junho.
- BAETA NEVES, C.M. (1949).** A seca dos sobreiros. *Gazeta das Aldeias*, **2168**: 730-734. Outubro.
- BAETA NEVES, C.M. (1954).** A morte dos sobreiros no Vale do Tejo. *Gazeta das Aldeias*, **2284**: 568-570. Agosto.
- BAILEY, J.A. (1986).** *Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions* (Nato Asi Series. Series H, Cell Biology, Vol 1). Springer-Verlag. ISBN: 0387167994.
- BARROS, M.C.; MATEUS, F. e RODRIGUES, J.M.G. (2002).** The main regions of cork oak decline in Portugal. *Working Group “Integrating Protection in Oak Forests”, Proceedings of the meeting at Oeiras*. Lisbonne (Portugal), 1-4 octobre, 2001. IOBC/wprs Bulletin Vol. 25(5) (Editado por C. Villemant e E. Sousa). Pág. 1-4. ISBN: 92-9067-142-2.
- BERNARDO, A.; GOMES, A.A.; EVARISTO, I.; TINOCO, I. e SARAIVA, A. (1992).** Um exemplo de mortalidade de montado de sobreiro na região do Cercal – Herdade da Cordeira In: *2º Encontro Sobre os Montados de Sobreiro e Azinho*, 4 e 5 de Junho, Évora. Pág. 238-247.

- BIANCO, M.C.; di BRISCO, D.; LUISI, N. e LERARIO, P. (2001).** Pathogenicity of *Phytophthora* species on *Quercus* seedlings. *Second International IUFRO Meeting on Phytophthora in Forests and Natural Ecosystems*. 30 September- 5 October, Perth and Albany, Western Australia.
- BIANCO, P.M; FANELLI, G.; TESCAROLLO, P. e PIGNATTI, S. (2003).** Ruderalization in a roman park as a result of changing management. *Urban Habitats*, **1(1)**: 87-104. ISSN 1541-7115.
- BLASCHKE, H. (1994).** Decline symptoms on roots of *Quercus robur*. *European Journal of Forest Pathology*, **24**: 386-398.
- BLODGETT, R. (2001).** Most probable number from serial dilutions (Appendix 2) *In: FDA: Bacteriological Analytical Manual Online* (Coordenadores de Projecto George J. Jackson, Robert I. Merker e Ruth Bandler – 8ª Edição). U.S. Department of Health and Human Services – U.S. Food & Drug Administration – Center for Food Safety & Applied Nutrition.
- BOCCON-GIBOD, J. (1989a).** La technologie de la culture *in vitro*. *In: La Culture In Vitro et ses Applications Horticoles* (Editado por R. Augé, G. Beauchesne, J. Boccon-Gibod, L. Decourtye, B. Digat, R. Jalouzot, R. Minier, J.-Cl. Morand, J.P. Reynoird, D.G. Strullu, H. Vidalie) (3ª edição revista , corrigida e aumentada). Technique et Documentation-Levoisier, J.B. Bailliére. Paris. ISBN: 2-85206-504-5.
- BOCCON-GIBOD, J. (1989b).** Les besoins nutritifs des tissus cultivés en conditions aseptiques. *In: La Culture In Vitro et ses Applications Horticoles* (Editado por R. Augé, G. Beauchesne, J. Boccon-Gibod, L. Decourtye, B. Digat, R. Jalouzot, R. Minier, J.-Cl. Morand, J.P. Reynoird, D.G. Strullu, H. Vidalie) (3ª edição revista , corrigida e aumentada). Technique et Documentation-Levoisier, J.B. Bailliére. Paris. ISBN: 2-85206-504-5.
- BOCCON-GIBOD, J. e JALOUZOT, R. (1989).** La Biotechnologie en horticulture: Possibilités et perspectives. *In: La Culture In Vitro et ses Applications Horticoles* (Editado por R. Augé, G. Beauchesne, J. Boccon-Gibod, L. Decourtye, B. Digat, R. Jalouzot, R. Minier, J.-Cl. Morand, J.P. Reynoird, D.G. Strullu, H. Vidalie) (3ª edição revista , corrigida e aumentada). Technique et Documentation-Levoisier, J.B. Bailliére. Paris. ISBN: 2-85206-504-5.
- BORDACS, S. e KORANKI, P. (1993).** Electrophoretic differentiation possibilities within the genus *Quercus* by means of protein monomers. *Silvae genetica*, **42(6)**: 285-288.
- BOUHARAOUA, R.T.; VILLEMANT, C.; KHELIL, M.A. e BOUCHAOUR, S. (2002).** Situation sanitaire de quelques subéraies de l'Ouest Algérien: impact des xylophages. *Working Group "Integrating Protection in Oak Forests", Proceedings of the meeting at Oeiras*. Lisbonne (Portugal), 1-4 octobre, 2001. IOBC/wprs Bulletin Vol. 25(5) (Editado por C. Villemant e E. Sousa). Pág. 85-92. ISBN: 92-9067-142-2.
- BRAISSANT, O.; CAILLEAU, G.; ARAGNO, M. e VERRECCHIA, E.P. (2004).** Biologically induced mineralization in the tree *Milicia excelsa* (Moraceae): its causes and consequences to the environment. *Geobiology*, **2(1)**: 59-66.
- BRANQUINHO D'OLIVEIRA (1931).** Apontamentos para o estudo de duas doenças do sobreiro. *Revista Agronómica*, **XIX(2)**: 5-24.
- BRASIER, C.M. (1983).** Problems and prospects in *Phytophthora* research. *In: Phytophthora – Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology* (Editado por D.C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia and P.H. Tsao). The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. Pág. 351-364. ISBN: 0890540845.

- BRASIER, C.M. (1992a).** Evolutionary biology of *Phytophthora* – Part I: Genetic system, sexuality and the generation of variation. *Annual Review of Phytopathology*, **30**: 153-171.
- BRASIER, C.M. (1992b).** Oak tree mortality in Iberia. *Nature*, **360**: 539.
- BRASIER, C.M. (1992c).** *Phytophthora cinnamomi* as a contributory factor in European oak declines. *Proceedings of an International Congress – Recent Advances in Studies on Oak Decline* (Ed. N. Luisi, P. Lerario e A. Vannini), Italy, September 13-18.
- BRASIER, C.M. (1996).** *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern europe. environmental constraints including climate change. *Annales des Sciences Forestieres*, **53**: 347-358.
- BRASIER, C.M. e SCOTT, J.K. (1994).** European oak declines and global warming: a theoretical assessment with special reference to the activity of *Phytophthora cinnamomi*. *EPPO Bulletin*, **24**: 221-232.
- BRASIER, C.M.; ROBREDO, F. e FERRAZ, J.F.P. (1993).** Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in iberian oak decline. *Plant Physiology*, **42**: 140-145.
- BRISON, M. e MAMANT, A. (1990).** Callus formation from root protoplasts of *Quercus rubra* L. (red oak). *Plant Cell Reports*, **9**: 139-142.
- BROADBENT, P. e BAKER K.F. (1974).** Association of bacteria with sporangium formation and breakdown of sporangia in *Phytophthora* spp. *Australian Journal of Agricultural Research* **25**(1): 139-145
- BUTCHER, D.N. e INGRAM, D.S. (1976).** *Plant Tissue Culture*. Edward Arnold, London, 67 páginas.
- BYRT, P. e GRANT, B.R. (1979).** Some conditions governing zoospores production in axenic cultures of *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Australian Journal of Botany*, **27**: 103-115.
- CABRAL, M.T. e SARDINHA, R.M.A. (1992).** Perspectiva integrada do declínio dos montados de sobro Alentejanos In: 2º Encontro Sobre os Montados de Sobro e Azinho, 4 e 5 de Junho, Évora. Pág. 217-231.
- CAHILL, D.M.; WESTE, G.M. e GRANT, B.R. (1986).** Changes in Cytokinin Concentrations in Xylem Extrudate following Infection of *Eucalyptus marginata* Donn ex Sm with *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Plant Physiology*, **81**: 1103-1109.
- CARLILE, M.J. e WATKINSON, S. (1994).** *The Fungi*. Academic Press. London.
- CHAKALI, G.; ATTAL-BEDREDDINE, A. e OUZANI, H. (2002).** Les insectes ravageurs des chênes, *Quercus suber* et *Q. ilex*, en Algérie. Working Group “Integrating Protection in Oak Forests”, *Proceedings of the meeting at Oeiras*. Lisbonne (Portugal), 1-4 octobre, 2001. IOBC/wprs Bulletin Vol. 25(5) (Editado por C. Villemant e E. Sousa). Pág. 93-100. ISBN: 92-9067-142-2.
- CHALEFF, R.S. (1988).** Herbicide-resistant plants from cultured cells. In: *Ciba Foundation Symposium, 137 – Applications of Plant Cell and Tissue Culture* (1987: Kyoto, Japan). John Wiley and Sons. New York. ISBN: 0471918865.
- CHALUPA, V. (1990).** Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured immature embryos of oak (*Quercus robur* L.) and liden (*Tilia cordata* Mill.). *Plant Cell Reports*, **9**: 398-401.

- CHAMBERS, S.M.; HARDHAM, A.R. e SCOTT, E.S. (1995).** In planta immunolabelling of three types of peripheral vesicles in cells of *Phytophthora cinnamomi* infecting chestnut roots. *Mycological Research*, **99**(11): 1281-1288.
- CHASAN, R. (1994).** Disease resistance: beyond the R genes. *The Plant Cell*, **6**: 461-463.
- CHEN, D.-W. e ZENTMYER, G.A. (1970).** Production of sporangia by *Phytophthora cinnamomi* in axenic culture. *Mycologia*, **62**: 397-402.
- CHERN, L.L. e KO, W.H. (1993).** Effects of light on hormonal regulation of sexual reproduction in *Phytophthora parasitica*. *Canadian Journal of Botany*, **71**: 1672-1674.
- CHRAMBACH, A e RODBARD, D. (1971).** Polyacrylamide gel electrophoresis. *Science*, **172**: 440-451.
- CIESLA, W.M. (2002).** *Non-wood forest products from temperate broad-leave – Non-wood forest products*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. ISBN: 92-5-104855-X.
- CREELMAN, R.A. e MULLET, J.E. (1995).** Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**: 4114-4119.
- DANIEL R.; WILSON B.A.; CAHILL D.M. (2005).** Potassium phosphonate alters the defence response of *Xanthorrhoea australis* following infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Australasian Plant Pathology*, **34**: 541-548.
- DAVID, T.S. (2005).** Componente arbórea dos montados: relações árvore-água. *Livro de Resumos do Workshop “Sustentabilidade dos sistemas agroflorestais mediterrânicos”* (Núcleo de Ecofisiologia Vegetal do INIAP). Estação Nacional de Melhoramento de Plantas. Elvas. 20 e 21 de Junho.
- DAVISON, E.M.; STUKELY, M.J.C.; CRANE, C.E. e TAY, F.C.S. (1994).** Invasion of phloem and xylem of woody stems and roots of *Eucalyptus marginata* and *Pinus radiata* by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, **84**: 335-340.
- de WIT (1986).** Elicitation of active resistance mechanisms. In: *Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions* (Editado por J. A. Bailey, Nato Asi Series, Series H, Cell Biology, Vol 1). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Pág. 149-170. ISBN: 0387167994.
- de ZOETEN, G.A.; GAARD, G.; HABERLACH, G.T. e HELGESON, J.P. (1982).** Infection of tobacco callus by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Phytopathology*, **72**: 743-746.
- DEATON, W.R.; KEYES, G.J. e COLLINS, G.B. (1982).** Expressed resistance to black shank among tobacco callus cultures. *Theoretical and Applied Genetis*, **63**: 65-70.
- DELATOUR, C.; ANSELM, N.; BARZANTI, P.; BIANCO, M-C.; BLASCHKE, H.; BRASIER, C.M.; CAPRETTI, P.; DESPREZ-LOUSTAU, M.-L.; DREYER, E.; HANSEN, E.M.; HEYNE, C.; JUNG, T.; LUISI, N.; MARÇAIS, B.; MATYSSEK, R.; MAUREL, M.; OSWALD, W.; PAOLETTI, E.; RAGAZZI, A.; ROBIN, C.; VANNINI, A. e VETTRAINO, A.-M. (2001).** *Phytophthora* in the European oak forest: Results of a European Union research project. *Second International IUFRO Meeting on Phytophthora in Forests and Natural Ecosystems*. 30 September- 5 October, Perth and Albany, Western Australia.
- DIXON, R.A. e LAMB, C.J. (1990).** Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **41**: 339-367.

- DODDS, J.H. e ROBERTS L.W. (1986).** *Experiments in plant tissue culture*. 2ª Edição. Cambridge University Press. New York. 232 páginas.
- DRENTH, A. e GUEST, D.I. (2004).** Principles of *Phytophthora* disease management. In: *Diversity and Management of Phytophthora in Southeast Asia* (Capítulo 7.1., Editado por André Drenth e David I. Guest). ACIAR, Monograph 114. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia. Pág. 154-160. ISBN: 1 86320 406 7.
- DUDZINSKI, M.J., OLD, K.M. e GIBBS, R.J. (1993).** Pathogenic variability in Australian isolates of *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Journal of Botany*, **41**: 721-732.
- DUNIWAY, J.M. (1983).** Role of physical factors in the development of *Phytophthora* diseases. In: *Phytophthora – Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology* (Editado por D.C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia and P.H. Tsao). The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. Pág. 175-197. ISBN: 0890540845.
- DURZAN, D.J. (1988).** Applications of cell and tissue culture in tree improvement. In: *Ciba Foundation Symposium, 137 – Applications of Plant Cell and Tissue Culture* (1987: Kyoto, Japan). John Wiley and Sons. New York. ISBN: 0471918865.
- DUTTON, M.V. e EVANS, C.S. (1996).** Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Canadian Journal of Microbiology*, **42**(9): 881-895.
- EL MATAOUI, M. e ESPAGNAC, H. (1989).** Comportement in vitro d'embryons zygotiques de chêne liège (*Quercus suber* L.) excisés à divers stades de leur développement. *Annales des Sciences Forestières*, **46** Suppl. 145s-148s.
- ELLINGBOE, A.H. (2001).** Plant-pathogen interactions: Genetic and comparative analyses. *European Journal of Plant Pathology*, **107**(1): 79-84.
- ELLIOTT, C.G. (1983).** Physiology of sexual reproduction in *Phytophthora*. In: *Phytophthora – Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology* (Editado por D.C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia and P.H. Tsao). The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. Pág. 71-80. ISBN: 0890540845.
- EL-TARABILY, K. A.; SYKES, M. L.; KURTBOKE, I.D.; HARDY, G.E.St.J.; BARBOSA, A.M. e DEKKER, R.F.H. (1996).** Synergistic effects of a cellulase-producing *Micromonospora carbonacea* and an antibiotic producing *Sytreptomyces violascens* on the suppression of *Phytophthora cinnamomi* root rot of *Banksia grandis*. *Canadian Journal of Botany*, **74**: 618-624.
- EMPPPO/OEMPP (2004).** Diagnostic protocols for regulated pests / Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés – *Phytophthora cinnamomi* [PM 7/26(1)]. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, **34**: 201–207.
- ERWIN, D.C. e RIBEIRO, O.K. (1996).** *Phytophthora. Diseases Worldwide*. APS Press – The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. Pág. 1-7, 42-95, 269-280. ISBN: 0-89054-212-0.
- FERAUD-KELLER, C. e ESPAGNAC, H. (1989).** Condition d'apparition d'une embryogenèse somatique sur des cals issus de la culture de tissus foliaires du chêne vert (*Quercus ilex*). *Canadian Journal of Botany*, **67**: 1066-1070.
- FERAUD-KELLER, C.; EL MATAOUI, M.; GOUIN, O. e ESPAGNAC, H. (1989).** Embryogenèse somatique chez trois espèces de chênes méditerranéens. *Annales des Sciences Forestières*, **46** Suppl., 130s-132s.

- FERNÁNDEZ-GUIJARRO, B.; CELESTINO, C. e TORIBIO, M. (1995).** Influence of external factors on secondary embryogenesis and germination in somatic embryos from leaves of *Quercus suber*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **41**: 99-106.
- FINLAY, A.R. e McCracken, A.R. (1991).** Microbial suppression of *Phytophthora cinnamomi*. In: *Phytophthora* (Editado por J. A. Lucas, R. C. Shattock, D. S. Shaw e L. R. Cooke) (Capítulo 26). Symposium of the British Mycological Society, the British Society for Plant Pathology and the Society of Irish Plant Pathologists – Trinity College, Dublin (Setembro 1989). Cambridge University Press. Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney. Pág. 383-398. ISBN: 0-521-40080-5.
- FOWLER, M.W. (1988).** Problems in commercial exploitation of plant cell cultures. In: *Ciba Foundation Symposium, 137 – Applications of Plant Cell and Tissue Culture* (1987 : Kyoto, Japan). John Wiley and Sons. New York. ISBN: 0471918865.
- FRANCESCHINI, A. ; MADAU, L. e MARRAS, F. (2002).** Incidência d'endófitos fongicos implicados dans le dépérissement du chêne-liège. *Working Group "Integrating Protection in Oak Forests", Proceedings of the meeting at Oeiras*. Lisbonne (Portugal), 1-4 octobre, 2001. IOBC/wprs Bulletin Vol. 25(5) (Editado por C. Villemant e E. Sousa). Pág. 29-36. ISBN: 92-9067-142-2.
- FRANCO, J.A. (1990).** *Quercus* L. In: *Flora Iberica: Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares - Vol. II – Plantaceae – Plumbaginaceae* (Editado por Castroviejo, S.; Lainz, M.; Gonzalez, G. L.; Montserrat, P.; Garmendia, F. M.; Paiva, J. e Villar, L.). Real Jardín Botánico, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Madrid. Pág. 15-36.
- GEORGE, E.F. (1993).** *Plant Propagation by Tissue Culture* (Part 1 – The technology.). Exegetics Limited . Edington. ISBN: 0950932566.
- GISI, U. (1983).** Biophysical aspects of the development of *Phytophthora*. In: *Phytophthora – Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology* (Editado por D.C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia and P.H. Tsao). The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. Pág. 109-119. ISBN: 0890540845.
- GOMES, A.A. (2005).** Aspectos da nutrição do sobreiro, relação com os factores do meio e os sistemas culturais. *Livro de Resumos do Workshop "Sustentabilidade dos sistemas agroflorestais mediterrânicos"* (Núcleo de Ecofisiologia Vegetal do INIAP). Estação Nacional de Melhoramento de Plantas. Elvas. 20 e 21 de Junho.
- GOMES, L. (1989).** Selecção e micropropagação em *Quercus suber* L.. Curso de Mestrado em Selecção Vegetal e Recursos Naturais Renováveis. Tese de Mestrado. Departamento de Biologia Vegetal. *Faculdade de Ciências de Lisboa*. Pág. 1-57.
- GONÇALVES, J.C.D.D. E RAINHO, C.M.T. (1992).** Micropropagação de sobreiro (*Q. suber* L.) por rebentamento axilar. In: *2º Encontro Sobre os Montados de Sobreiro e Azinho*, 4 e 5 de Junho, Évora. 109-118.
- GÖTESSON, A.; MARSHALL, J.S.; JONES, D.A. e HARDHAM, A.R. (2002).** Characterization and Evolutionary Analysis of a Large Polygalacturonase Gene Family in the Oomycete Plant Pathogen *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **15**(9): 907-921
- GOZZO, F. (2004).** Systemic acquired resistance in crop protection. *Outlooks on Pest Management*, **15**(1): 20-23.
- GRAHAM, T.L. e GRAHAM, M.Y. (1999).** Role of hypersensitive cell death in conditioning elicitation competency and defense potentiation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **55**: 13-20.

- GREGORY, P.H. (1983).** Some major epidemics caused by *Phytophthora*. In: *Phytophthora – Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology* (Editado por D.C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia and P.H. Tsao). The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. Pág. 271-278. ISBN: 0890540845.
- HALSALL, D.M. (1976).** Zoospore chemotaxis in australian isolates of *Phytophthora* species. *Canadian Journal of Microbiology*, **2**: 409-422.
- HALSALL, D.M. e FORRESTER, R.I. (1977).** Effects of certain cations on the formation and infectivity of phytophthora zoospores. 1. Effects of calcium, magnesium, potassium, and iron ions. *Canadian Journal of Microbiology*, **23**: 994-1001.
- HAMMOND-KOSACK, K.E. e JONES, J.D.G. (1996).** Resistance gene--dependent plant defense responses. *The Plant Cell*, **8**: 1773-1791.
- HANSEN, E. (2003).** *Phytophthora* in North American forests. *Sudden Oak Death Online Symposium*. www.apsnet.org/online/SOD (website of The American Phytopathological Society). doi:10.1094/SOD-2003-EH.
- HARDHAM, A.R. (2005).** Pathogen profile: *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology*, **6**(6): 589–604. doi: 10.1111/J.1364-3703.2005.00308.
- HARDHAM, A.R. (2006).** Cell biology of plant–oomycete interactions-Microreview. *Cellular Microbiology*: 1-9. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00833.x.
- HARDHAM, A.R.; CAHILL, D.M.; COPE, M.; GABOR, B.K.; GLUBER, F. e HYDE, G.J. (1994).** Cell surface antigens of *Phytophthora* spores: Biological and taxonomic characterization. *Protoplasma*, **181**: 213-232.
- HEATH, M.C. e STUMPF, M.A. (1986).** Ultrastructural observations of penetration sites of the cowpea rust fungus in untreated and silicon-depleted French bean cells. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **29**: 27-39.
- HELGESON, J.P.; HABERLACH, G.T. e UPPER, C.D. (1976).** A dominant gene conferring disease resistance to tobacco plants is expressed in tissue cultures. *Phytopathology*, **66**: 91-96.
- HELGESON, J.P.; KEMP, J.D.; HABERLACH, G.T. e MAXWELL, D.P. (1972).** A tissue culture system for studying disease resistance: the black shank disease in tobacco callus cultures. *Phytopathology*, **62**: 1439-1443.
- HENDRIX, J.W. (1964).** Sterol induction of reproduction and stimulation of growth of *Pythium* and *Phytophthora*. *Science*, **144**: 1028-1029.
- HO, H.H. e ZENTMYER, G.A. (1977).** Morphology of *Phytophthora cinnamomi*. *Mycologia*, **69**: 701-713.
- HOHL, H.R. (1983).** Nutrition of *Phytophthora*. In: *Phytophthora – Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology* (Editado por D.C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia and P.H. Tsao). The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. Pág. 41-54. ISBN: 0890540845.
- HOHL, H.R. (1991).** Surface-related host-pathogen interactions in *Phytophthora*. In: *Phytophthora* (Editado por J. A. Lucas, R. C. Shattock, D. S. Shaw e L. R. Cooke) (Capítulo 6). Symposium of the British Mycological Society, the British Society for Plant Pathology and the Society of Irish Plant Pathologists – Trinity College, Dublin (Setembro 1989). Cambridge University Press. Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney. Pág. 70-89. ISBN: 0-521-40080-5.

- HÜBERLI, D.; TOMMERUP, I.C.; DOBROWOLSKI, M.P.; CALVER, M.C. e HARDY, G.E.ST.J. (2001).** Phenotypic variation in a clonal lineage of two *Phytophthora cinnamomi* populations from Western Australia. *Mycological Research*, **105**(9): 1053-1064.
- HUSSEY, G. (1986).** Vegetative propagation of plants by tissue culture. In: *Plant Cell Culture Technology* (Editado por M.M. Yeoman) (Botanical Monographs – Volume 23). Oxford. Blackwell Scientific Publications. p. 29-66.
- IRWIN, J.A.G.; CAHILL, D.M. e DRENTH, A. (1995).** *Phytophthora* in Australia. *Australian Journal of Agricultural Research*, **46**: 1311-1337.
- JANG, J.C. e TAINTER, F.H. (1990).** Cellular responses of pine callus to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, **80**: 1347-1352.
- JANG, J.C. e TAINTER, F.H. (1991).** Optimum tissue culture conditions for selection of resistance to *Phytophthora cinnamomi* in pine callus tissue. *Plant Cell Reports*, **9**(9): 488 – 491.
- JÖNSSON, U.; LUNDBERG, L.; SONESSON, K.; JUNG, T. (2003).** First records of soilborne *Phytophthora* species in Swedish oak forests. *Forest Pathology*, **33**(3): 175–179.
- JUNG, T. e BLASCHKE, H. (1995a).** *Phytophthora* root rot in declining forest trees. *Phyton* (Horn, Austria), **36**(3): 95-102.
- JUNG, T. e BLASCHKE, H. (1995b).** *Phytophthora* root rot in declining forest trees. Proc. of Biofosp, Ljubljana, August, **22-31**: 153-157.
- JUNG, T.; BLASCHKE, H. e NEUMANN, P. (1996).** Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. *European Journal fo Forestry Pathology*, **266**: 253-272.
- JUNG, T.; BLASCHKE, H. e OSSWALD, W. (2001).** Effect of environmental constraints on *Phytophthora*-mediated oak decline in Central Europe. *Second International IUFRO Meeting on Phytophthora in Forests and Natural Ecosystems*. 30 September- 5 October, Perth and Albany, Western Australia.
- KHEW, K.L. e ZENTMYER, G.A. (1973).** Chemotactic response of zoospores of five species of *Phytophthora*. *Phytopathology*, **63**: 1511-1517.
- KINAL, J.; SHEARER, B.L. e FAIRMAN, R.G. (1993).** Dispersal of *Phytophthora cinnamomi* through lateritic soil by laterally flowing subsurface water. *Plant Disease*, **77**: 1085-1090.
- KOMBRINK, E.; BOLLMANN, J.; HAUFFE, K.D.; KNOGGE, W.; SCHEEL, D.; SCHMELZER, E.; SOMSSICH, I. e HAHLBROCK, K. (1986).** Biochemical responses of non-host plant cells to fungi and fungal elicitors. In: *Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions* (Editado por J. A. Bailey, Nato Asi Series, Series H, Cell Biology, Vol 1). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Pág. 253-262. ISBN: 0387167994.
- LAEMMLI, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- LAMB, C. e DIXON, R.A. (1997).** The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Molecular Biology*, **48**: 251-275.
- LAPEÑA, I. e TUSET, J.J. (2002).** Influence of electrical conductivity due to nitrogen on *Phytophthora* infection in seedlings of *Quercus rotundifolia*. Working Group “Integrating Protection in Oak Forests”, *Proceedings of the meeting at Oeiras*. Lisbonne (Portugal), 1-4

- octobre, 2001. IOBC/wprs Bulletin Vol. 25(5) (Editado por C. Villemant e E. Sousa). Pág. 57-60. ISBN: 92-9067-142-2.
- LEUBA, V. e LETOURNEAU, D. (1990).** Auxin activity of phenylacetic acid in tissue culture. *Journal of Plant Growth Regulation*, **9**(1-3): 71-76.
- LOUREIRO, A. e RODRIGUES, A. (1992).** Presente e futuro dos montados de sobro e de azinho em Trás-os-Montes. In: *c os Montados de Sobro e Azinho*, 4 e 5 de Junho, Évora. Pág. 21-25.
- MACHADO, H. (2005).** Factores bióticos associados ao declínio do montado. *Livro de Resumos do Workshop "Sustentabilidade dos sistemas agroflorestais mediterrânicos"* (Núcleo de Ecofisiologia Vegetal do INIAP). Estação Nacional de Melhoramento de Plantas. Elvas. 20 e 21 de Junho.
- MADER, S.S. (1985).** *Biology*. Wm. C. Brown Publishers.
- MAGNUSON, J.K. e LASURE, L.L. (2004).** Organic acid production by filamentous fungi In: *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture and Medicine*. (Editado por Jan S Tkacz e Lene Lange) (Capítulo 12). Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York. Pág. 307-340. ISBN: 0306478668.
- MANZANERA, J.A. (1992).** Induccion de embriogenesis somatica en roble (*Quercus suber* L.). *Investigacion Agraria, Sistemas Y Recursos Forestales*, **1**(1): 73-81.
- MANZANERA, J.A. e PARDOS, J.A. (1990).** Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L.. *Plant Cell, Tissue and Organ*, **21**: 1-8.
- MAROCO, J. (2003).** Análise estatística – Com utilização do SPSS. Edições Sílabo, Lda. Lisboa. ISBN: 972-618-298-0.
- MARONEK, D.M. e HENDRIX, J.W. (1978).** Resistance to race 0 of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* in tissue culture of a tobacco breeding line with black shank resistance derived from *Nicotiana longiflora*. *Phytopathology*, **68**: 233-234.
- McCOMB, J.A.; HINCH, J.M. e CLARKE, A.E. (1987).** Expression of field resistance in callus tissue inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, **77**: 346-351.
- MÉTRAUXS, J.-P. (2001).** Systemic Acquired resistance and salicylic acid: Current state of knowledge. *European Journal of Plant Pathology*, **107**(1): 13-18.
- MILLER, P.M. (1955).** V-8 juice agar as a general purpose medium for fungi and bacteria. *Phytopathology*, **45**: 461-462.
- MILLER, S.A. (1987).** Tissue culture media in plantpathology III. Fungi. In: *Plant Cell Cultures – A Pratical Approach* (Editado por Dixon, R.A.). IRL Press. Oxford, Washington DC.
- MILLER, S.A.; DAVIDSE, L.C. e MAXWELL, D.P. (1984).** Expression of genetic susceptibility, host resistance, and nonhost resistance in alfalfa callus tissue inoculated with *Phytophthora megasperma*. *Phytopathology*, **74**: 345-348.
- MIRCETICH, S.M. e MATHERON, M.E. (1976).** *Phytophthora* root and crown rot of cherry trees. *Phytopathology*, **66**: 549-558.
- MIRCETICH, S.M.; CAMPBELL, R.N. e MATHERON, M.E. (1977).** *Phytophthora* trunk cacer of coast live oak and cork oak trees in California. *Plant Disease Reporter*, **61**(2): 66-70.

- MONIZ, M.F.; TOMAZ, I.L.; CABRAL, M.T. e BASTO, M.S. (1996).** Avaliação da patogenicidade de *Phytophthora cinnamomi* Rands em sobreiro (*Quercus suber* L.). *Silva Lusitana*, **4**(1): 79-88.
- MOREIRA, A.C. (2005).** Impacto de *Phytophthora cinnamomi* no declínio de sobreiros e de azinheiras. *Livro de Resumos do Workshop "Sustentabilidade dos sistemas agroflorestais mediterrânicos"* (Núcleo de Ecofisiologia Vegetal do INIAP). Estação Nacional de Melhoramento de Plantas. Elvas. 20 e 21 de Junho.
- MOREIRA, C. (2002).** Distribution of *Phytophthora cinnamomi* in cork oak stands in Portugal. *Working Group "Integrating Protection in Oak Forests", Proceedings of the meeting at Oeiras*. Lisbonne (Portugal), 1-4 octobre, 2001. IOBC/wprs Bulletin Vol. 25(5) (Editado por C. Villemant e E. Sousa). Pág. 41-48. ISBN: 92-9067-142-2.
- MUNIR, E.; YOON, J.J.; TOKIMATSU, T.; HATTORI, T. e SHIMADA, M. (2001).** A physiological role for oxalic acid biosynthesis in the wood-rotting basidiomycete *Fomitopsis palustris*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**(20): 11126–11130.
- NATIVIDADE, J.V. (1990).** *Subericultura*. Imprensa Nacional Casa-da-Moeda (2ª Edição Fac-Similada da 1ª Edição de 1950). Pág. 292.
- OLD, K.M.; MORAN, G.F. e BELL, J.C. (1984).** Isozyme Variability among isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Australia and Papua New Guinea. *Canadian Journal of Botany*, **62**: 2016-2022.
- OSTROLUCKÁ, M.G. e BEZO, M. (1994).** Utilization of meristem cultures in propagation of oak (*Quercus* sp.). *Genetica Polonica*. **35**(3):161-169.
- PARKER, J.E.; KNOGGE, W. e SHEEL, D (1991).** Molecular aspects of host-pathogen in *Phytophthora*. In: *Phytophthora* (Editado por J. A. Lucas, R. C. Shattock, D. S. Shaw e L. R. Cooke) (Capítulo 7). Symposium of the British Mycological Society, the British Society for Plant Pathology and the Society of Irish Plant Pathologists – Trinity College, Dublin (Setembro 1989). Cambridge University Press. Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney. Pág. 90-103. ISBN: 0-521-40080-5.
- PAUSAS, J.G. (1997).** Resprouting of *Quercus suber* in NE Spain after fire. *Journal of Vegetation Science*, **8**: 703–706.
- PEROS, J.-P. e CHAGVARDIEFF, P. (1983).** Mise en evidence *in vitro* d'effets toxiques entre *Ustilago scitaminae* Syd. et des cals de canne a sucre; influence de deux facteurs de croissance sur les phenomenes observes. *Agronomie*, **3**(7): 629-634.
- PETERSON, F.P.; MILLER, S.A e GROTHAUS, G.D. (1990).** Monoclonal antibody-based immunoassays for detection of *Phytophthora* spp. in plants. (abstr) *Phytopathology*, **80**: 962.
- PETRIE, A. e SABIN, C. (2000).** *Medical Statistics at a Glance*. Osney Mead, Oxford. Blackwell Science. ISBN: 0-632-05075-6.
- PETRINI, L.E. (2003).** *Rosellinia* and related genera in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*, **41**: 71–138.
- PIMENTEL, A.A.L. (1945).** Novas observações sobre a morfologia, biologia e fisiologia de dois fungos do genero *Phytophthora* de Bary, parasitas do castanheiro. *Agronomia Lusitana*, **7**(4): 337-354.

- PIMENTEL, A.A.L. (1946).** Notas acerca do aparecimento da “Doença da Tinta” do castanheiro nos viveiros dos Serviços Florestais Portugueses. *Agronomia Lusitana*, **8**(4): 303-313.
- PIMENTEL, A.A.L. (1949).** A *Phytophthora cinnamomi* Rands, um outro agente, extremamente virulento, da doença da tinta do castanheiro. *Agronomia Lusitana*, **9**: 181-191.
- PINTO, M.P.M. (1995).** Estudo de proteínas relacionadas com a resposta de defesa de *Lupinus albus* L. a agentes patogenicos. Dissertação Apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa para a Obtenção do Grau de Doutor.
- PINTO, P. (1989).** *Grande Enciclopédia Portuguesa e Brasileira Ilustrada* (Volume X). Editorial Enciclopédia, Limitada. Lisboa, Rio de Janeiro. Pág. 751.
- PSCHIEDT, J.W.; BURKET, J. e FISHER, S. (1990).** Use of *Phytophthora* specific immunoassay kits in a plant disease clinic. *Phytopathology*, **80**: 962.
- PUIGDERRAJOIS, P.; FERNÁNDEZ-GUIJARRO, B.; TORIBIO, M. e MOLINAS, M. (1996).** Origin and Early Development of Secondary Embryos in *Quercus suber* L.. *International Journal of Plant Science*, **157**(6): 674-684.
- RAGAZZI, A.; MORICCA, S. e DELLAVALLE, I. (2002).** Current Situation of oak decline in Italy an in other European Countries. *Working Group “Integrating Protection in Oak Forests”, Proceedings of the Meeting at Oeiras*. Lisbonne (Portugal), 1-4 octobre, 2001. IOBC/wprs Bulletin Vol. 25(5) (Editado por C. Villemant e E. Sousa). Pág. 5-12. ISBN: 92-9067-142-2.
- REEVES, R.J. (1975).** Behaviour of *Phytophthora cinnamomi* Rands in Different Soils and Water Regimes. *Soil Biology and Biochemistry*, **7**: 19-24.
- RIBEIRO, O.K. (1983).** Physiology of asexual sporulation and spore germination in *Phytophthora*. In: *Phytophthora – Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology* (Editado por D.C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia and P.H. Tsao). The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. Pág. 55-70. ISBN: 0890540845.
- RICCI, P.; BONNET, P.; ABAD, P.; MOLOT, P.M.; MAS, P.; BRUNETEAU, M.; FABRE, I.; LHOMME, O. e MICHEL, G. (1986).** Differential elicitation activities of fractions from *Phytophthora* spp. on several host-plants. In: *Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions* (Editado por J. A. Bailey, Nato Asi Series, Series H, Cell Biology, Vol 1). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Pág. 191-196. ISBN: 0387167994.
- RIZIERO, T.; RAGAZZI, A.; MARIANELLI, L.; SABBATINI, P. e ROVERSI, P.F. (2002).** Insects and fungi involved in oak decline in Italy. *Working Group “Integrating Protection in Oak Forests”, Proceedings of the meeting at Oeiras*. Lisbonne (Portugal), 1-4 octobre, 2001. IOBC/wprs Bulletin Vol. 25(5) (Editado por C. Villemant e E. Sousa). Pág. 67-74. ISBN: 92-9067-142-2.
- ROBIN, C. (1992).** Trunk inoculations of *Phytophthora cinnamomi* in red oaks. *European Journal of Forest Pathology*, **22**: 157-165.
- ROBIN, C.; DESPREZ-LOUSTAU, M. -L. e DELATOUR, C. (1992a).** Factors influencing the enlargement of trunk canker of *Phytophthora cinnamomi* in red oak. *Canadian Journal of Forest Research*, **22**: 367-374.
- ROBIN, C.; DESPREZ-LOUSTAU, M.-L. e DELATOUR, C. (1992b).** Spacial and temporal enlargement of trunk cankers of *Phytophthora cinnamomi* in red oak. *Canadian Journal of Forest Research*, **22**: 362-366.

- ROBIN, C.; DESPREZ-LOUSTAU, M.L.; CAPRON, G. e DELATOUR C. (1998).** First record of *Phytophthora cinnamomi* on cork and holm oaks in France and evidence of pathogenicity. *Annales des Sciences Forestières*, **55** (8): 869-883.
- ROBIN, C.; DUPUIS, F. e DESPREZ-LOUSTAU, M.L. (1994).** Seasonal changes in Northern red oak susceptibility to *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Disease*, **78**: 367-374.
- RODRIGUES, M.L.; ARCHER, M.; MARTEL, P.; JACQUET, A.; CRAVADOR, A. e CARRONDO, M.A. (2002).** Crystal structure of b-cinnamomin, a toxic protein from *Phytophthora cinnamomi*. Communication in *XIX Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography*, Geneve, Switzerland, August.
- ROMANO, A. (1994).** Estudos *in vitro* em *Quercus suber* L.: Micropropagação, micorrização e conservação. Tese de Doutoramento. Departamento de Biologia Vegetal. *Faculdade de Ciências de Lisboa*. Pág. 2-61, 64-91, 94-129.
- ROMANO, A.; NORONHA, C. e MARTINS-LOUÇÃO, M.A. (1992).** Influence of growth regulators on shoot proliferation in *Quercus suber* L.. *Annals of Botany*, **70**: 531-536.
- ROMANO, A.; NORONHA, C.; CAÇORINO, C. e MARTINS-LOUÇÃO, M.A. (1992).** Técnicas de propagação aplicadas ao melhoramento do sobreiro. In: *2º Encontro Sobre os Montados de Sobre e Azinho*, 4 e 5 de Junho, Évora. Pág. 196-202.
- RYAN, S.A. e SCOWCROFT, W.R. (1986).** Tissue culture and plant breeding. In: *Plant Cell Culture Technology* (Editado por M.M. Yeoman) (Botanical Monographs – Volume 23). Oxford. Blackwell Scientific Publications.
- SAMPAIO, J.S. (1989).** O Sobreiro, a cortiça e o Homem – Aspectos Económicos do Caso Português. *Agricultura* 92, **9**: 20-25.
- SANTOS, M.N. (2003).** Contribuição para o Conhecimento das Relações *Quercus suber* – *Biscogniauxia mediterranea* (syn. *Hypoxylon mediterraneum*). *Silva Lusitana* **11** (1): 21 – 29.
- SANTOS, M.N.; BRAGANÇA, M.H. e CASIMIRO, P.P. (2005).** Microrganismos Associados à Cortiça em Diferentes Fases da sua Fileira. *Silva Lusitana* **13** (1): 75 – 93.
- SCHWEIZER, P.; BUCHALA, A.; SILVERMAN, P.; SESKAR, M.; RASKIN, I. e MÉTRAUX, J.-P. (1997).** Jasmonate-inducible genes are activated in rice by pathogen attack without a concomitant increase in endogenous jasmonic acid levels. *Plant Physiology*, **114**: 79-88.
- SEABRA, R.C. e PAIS, M.S. (1993).** Micropropagação de clones de castanheiro (*Castanea sativa* Mill.) resistentes à doença da tinta. *Silva Lusitana*, **1**(2): 169-181.
- SEABRA, R.C. e PAIS, M.S. (1999).** Transformação genética do castanheiro europeu (*Castanea sativa* Mill.). *Silva Lusitana*, **7**(2): 199-232.
- SHEARER, B.L. (1994).** The major plant pathogens occurring in native ecosystems of south-western Australia. *Journal of The Royal Society of Western Australia*, **77**: 113-122.
- SHEARER, B.L. e DILLON, M. (1996).** Susceptibility of plant species in Baksia Woodlands on the Swan Coastal Plain, Western Australia, to Infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Journal of Botany*, **44**: 433-445.
- SHIRASU, K.; NAKAJIMA, H.; RAJASEKHAR, V.K. e DIXON, R.A. (1997).** Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *The Plant Cell*, **9**: 261-270.

- SILVA TAVARES, J. (1927).** A doença dos castanheiros. *Brotéria* (Número Especial sobre agricultura na festiva comemoração do vigésimo aniversário da *Brotéria*): 15-17.
- SINGLETON, L.L.; MIHAIL, J.D. e RUSH, L.M. (1992).** Methods for research of soilborne phytopathogenic fungi. APS Press. St. Paul, Minnesota.
- SINHA, O.K. (1995).** Dual cultures: Fungi. In: *Molecular Methods in Plant Pathology* (Editado por R. P. Singh e U.S. Singh) Lewis Publishers. Boca Raton, London, Tokyo. Pág. 289-300.
- SLATER, A.; SCOTT, N. W. E FOWLER, M.R. (2003).** *Plant Biotechnology: The Genetic Manipulation of Plants*. Oxford University Press. Oxford. Pág. 35-53. ISBN: 0199254680.
- SMITH, I.M.; DUREZ, J.; LELLIOTT, R.A.; PHILLIPS, D.H. e ARCHER, S.A. (1988).** *European Handbook of Plant Disease*. Blackwell Scientific Publication. Pág. 213-215.
- SOMSSICH, I.E. e HAHLBROCK, K. (1998).** Pathogen defence in plants – a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science*, **3**(3): 86-90.
- SURICO, G. (1986).** Indoleacetic acid and cytokinins in the olive knot disease – An overview of their role and their genetic determinants. In: *Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions* (Editado por J. A. Bailey, Nato Asi Series, Series H, Cell Biology, Vol 1). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Pág. 315-330. ISBN: 0387167994.
- ŠVÁBOVÁ, L. e LEBEDA, A. (2005).** In Vitro Selection for Improved Plant Resistance to Toxin-Producing Pathogens. *Journal of Phytopathology*, **153**: 52-64.
- TAINTER, F.H., O'BRIEN, J.G., HERNANDEZ, A., OROZCO, F., e REBOLLEDO, O. (2000).** *Phytophthora cinnamomi* as a cause of oak mortality in the state of Colima, Mexico. *Plant Disease*, **84**: 394-398.
- TANNER, A. e BORNEMANN, S. (2000).** *Bacillus subtilis* YvrK is an acid-induced oxalate decarboxylase. *Journal of Bacteriology*, **182**(18): 5271–5273.
- TAVARES, J.F.S. (1994).** *Dicionário Verbo de Inglês Técnico e Científico*. Editorial Verbo.Lisboa, Pág. 154.
- TITOV, S.; BHOWMIK, S.K.; MANDAL, A. ALAM, M.S. e UDDIN S.N. (2006).** Control of Phenolic Compound Secretion and Effect of Growth Regulators for Organ Formation from *Musa* spp. cv. Kanthali Floral Bud Explants. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, **2**(3): 97-104.
- TOLEDO, J., ESPINOZA, N. e GOLMIRZAI, A. (1998).** *Tissue culture management of in vitro plantlets in potato seed production*. International Potato Center. Training manual. Lima, Peru. 46 pp. Disponível em: <http://www.cipotato.org/training/Materials/Tissue/Tissue.htm>
- TORRINHA, F. (1942).** *Dicionário Latino-Português*. Porto Editora.Porto. Pág. 284.
- TURCO, E; CLOSE , T.J.; FENTON, R.D. e RAGAZZI, A. (2004).** Synthesis of dehydrin-like proteins in *Quercus ilex* L. and *Quercus cerris* L. seedlings subjected to water stress and infection with *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **65**(3): 137-144.
- TYLER, B.M. (2002).** Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. *Annual Review of Phytopathology*, **40**: 137-167. ISSN 0066-4286.

- VANSTEENKISTEA, D.; TIRRYB, L.; VAN ACKERA, J. e STEVENSA, M. (2004).** Predispositions and symptoms of *Agilus* borer attack in declining oak trees. *Annals of Forest Science*, **61**: 815-823.
- WALTON, J.D. (1997).** Biochemical plant pathology. In: *Plant Biochemistry* (Editado por P.M. Dey e J.B. Harborne). Academic Press. San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto. Pág. 487-502. ISBN: 0122146743
- WAN, J.; DUNNING, M. e BENT, A.F. (2002).** Probing plant-pathogen interactions and downstream defense signaling using DNA microarrays. *Functional & Integrative Genomics*, **2**: 259-273.
- WAREING, P.F. e PHILLIPS, I.D.J. (1977).** *The Control of Growth and Differentiation in Plants* (2ª Edição). Pergamon Press. Oxford.
- WESTE, G. (1974).** *Phytophthora cinnamomi* – The cause of severe disease in certain native communities in Victoria. *Australian Journal of Botany*, **22**: 1-8.
- WESTE, G. e ASHTON, D.H. (1994).** Regeneration and survival of indigenous dry sclerophyll species in the Brisbane Ranges, Victoria, after a *Phytophthora cinnamomi* epidemic. *Australian Journal of Botany*, **42**: 239-253.
- WESTE, G. e MARKS, G.C. (1987).** The biology of *Phytophthora cinnamomi* in Australian forest. *Annual Reviews of Phytopathology*, **25**: 207-229.
- WESTE, G. e RUPPIN, P. (1975).** Factors affecting the population density of *Phytophthora cinnamomi* in native forests of the Brisbane Ranges, Victoria. *Australian Journal of Botany*, **23**: 77-85.
- WESTE, G. e RUPPIN, P. (1977).** *Phytophthora cinnamomi*: Population densities in forest soils. *Australian Journal of Botany*, **25**: 461-475.
- WESTE, G.; COOK, D. e TAYLOR, P. (1973).** The invasion of native forest by *Phytophthora cinnamomi* II. Post-infection vegetation patterns, regeneration, decline in inoculum, and attempted controls. *Australian Journal of Botany*, **21**: 13-29.
- WILLS, R.T. (1993).** The ecological impact of *Phytophthora cinnamomi* in the Stirling Ranges National Park, Western Australia. *Australian Journal of Ecology*, **18**: 145-159.
- ZENTMYER, G.A. (1965).** Bacterial stimulation of sporangium production in *Phytophthora cinnamomi*. *Science*, **144**: 1178-1179.
- ZENTMYER, G.A. (1976).** Distribution of the mating type of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, **66**: 701-703.
- ZENTMYER, G.A. (1977).** Origen of *Phytophthora cinnamomi*: Evidence that it is not an indigenous fungus in the Americas. *Phytopathology*, **67**: 1373-1377.
- ZENTMYER, G.A. (1983).** The world of *Phytophthora*. In: *Phytophthora – Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology* (Editado por D.C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia and P.H. Tsao). The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. Pág. 1-8. ISBN: 0890540845.
- ZENTMYER, G.A. (1988).** Origin and distribution of four species of *Phytophthora*. *Transaction of the British Mycological Society*, **91**(3): 367-378.
- ZENTMYER, G.A. (1994).** Plant pathology: A 55-year retrospective. *Annual Reviews of Phytopathology*, **32**: 1-19.

ZHENG, X.B. e KO, W.H. (1996). Continuing variation in successive asexual generation of *Phytophthora cinnamomi* following sexual reproduction. *Canadian Journal of Botany*, **74**: 1181-1185.

ZYRD J.P. (1988). *Cultures de Cellules, Tissus et Organes Végétaux*. Presses Polytechniques Romandes, Lausanne.

Sítios Consultados na Internet:

www.min-dgf.pt, Capturado em 3 de Agosto de 2006

<http://www.priberam.pt>, capturado em 22-08-2006

ANEXO I

Anexo I:

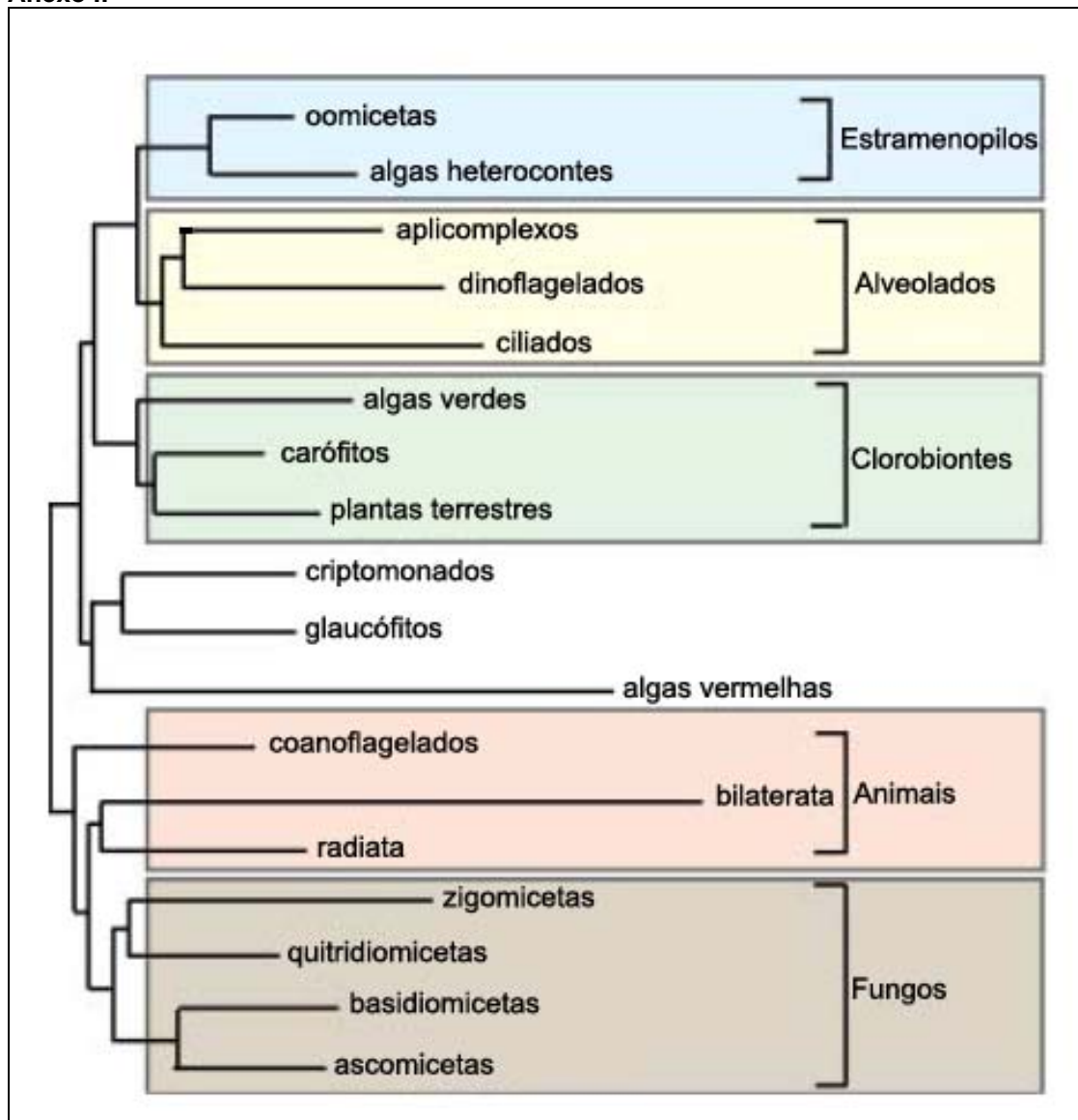


Fig. 0-1: Árvore filogenética mostrando as relações entre os principais grupo de eucariotas.

Existe uma relação íntima entre os Estramenopilos (que incluem os oomicetas) e os Avéolados (que incluem os aplicomplexos) [Adaptado de HARDHAM (2005)].

ANEXO II

Anexo II:

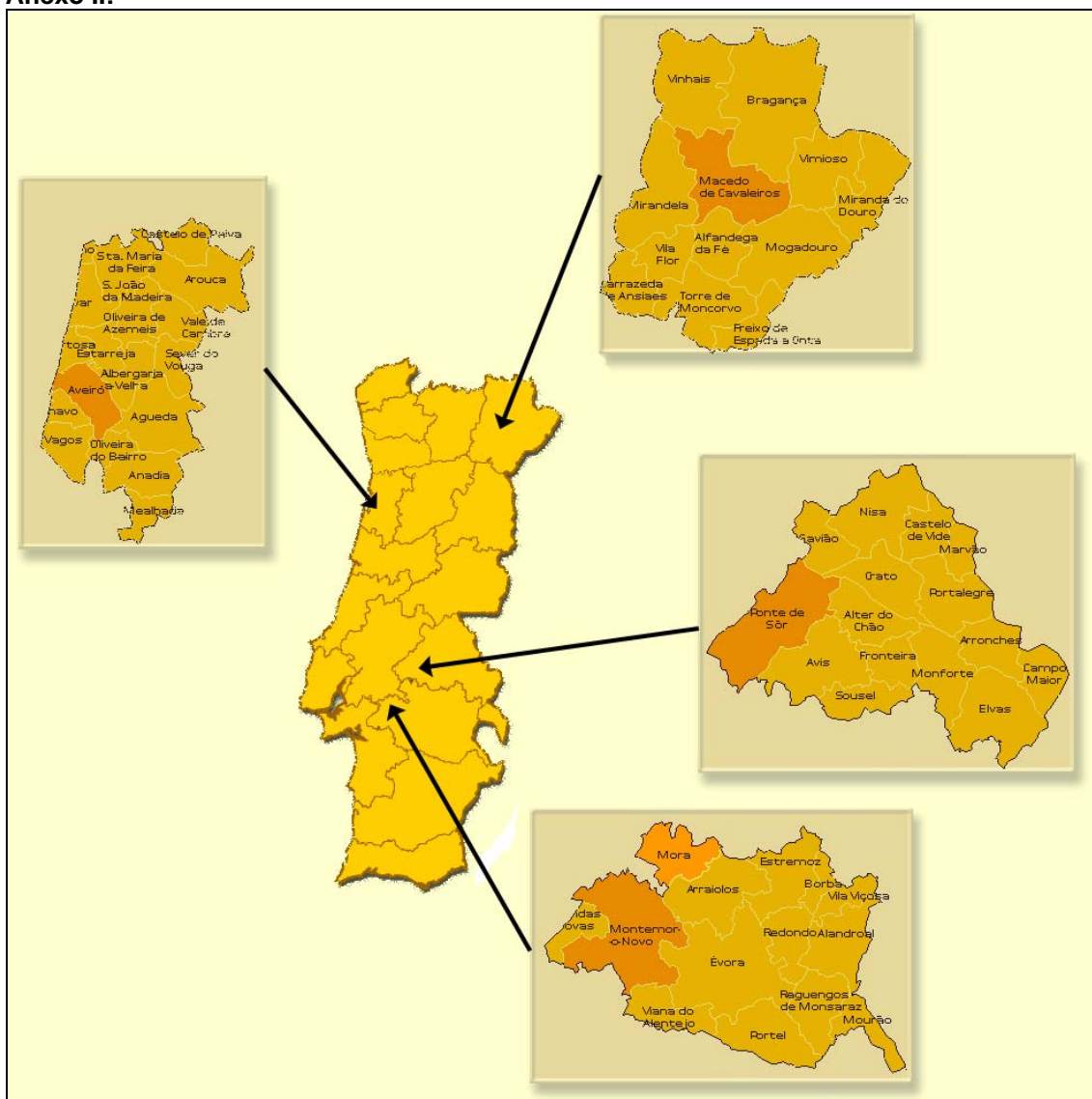


Fig. 0-2: Distribuição geográfica das regiões de origem das landes e do material adulto.

Na Fig. 0-2 apresenta-se a distribuição geográfica das regiões de origem das landes e do material adulto. As estações foram repartidas pelos concelhos de: Aveiro, Montemor-o-Novo, Ponte-de-Sôr, Mora (Évora) e Macedo de Cavaleiros. Em coloração destacada estão os concelhos de proveniência do material vegetal.

ANEXO III

Anexo III: Cronograma para produção de zoósporos – Método de BYRT e GRANT (1979)


Quarta-feira	Quinta-feira	Sexta-feira	Sábado	Domingo	Segunda-feira	Terça-feira	Quarta-feira	Quinta-feira	Sexta-feira	Sábado	Domingo	Segunda-feira	Terça-feira
V8A 10% Miracloth					V8B 5% 160 opm	Lavar 3x	Lavar 1x Chilling Zoósporos						
	V8A 10% Miracloth					V8B 5% 160 opm	Lavar 3x	Lavar 1x Chilling Zoósporos					
		V8A 10% Miracloth					V8B 5% 160 opm	Lavar 3x	Lavar 1x Chilling Zoósporos				
			V8A 10% Miracloth					V8B 5% 160 opm	Lavar 3x	Lavar 1x Chilling Zoósporos			
				V8A 10% Miracloth					V8B 5% 160 opm	Lavar 3x	Lavar 1x Chilling Zoósporos		
					V8A 10% Miracloth					V8B 5% 160 opm	Lavar 3x	Lavar 1x Chilling Zoósporos	
						V8A 10% Miracloth					V8B 5% 160 opm	Lavar 3x	Lavar 1x Chilling Zoósporos

= 0 dias fim-de-semana
 = 1 dia fim-de-semana
 = 2 dias fim-de-semana
 = mais de 2 dias fim-de-semana

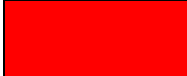
ANEXO IV


Anexo IV: Cronograma para produção de zoósporos – Método de Chambers *et al.* (1995)

Quarta-feira	Quinta-feira	Sexta-feira	Sábado	Domingo	Segunda-feira	Terça-feira	Quarta-feira	Quinta-feira	Sexta-feira	Sábado	Domingo	Segunda-feira	Terça-feira
V8A 10%			V8A 5%	Lavar 3x		Lavar 1x Chilling Zoósporos							
	V8A 10%			V8A 5%	Lavar 3x		Lavar 1x Chilling Zoósporos						
		V8A 10%			V8A 5%	Lavar 3x		Lavar 1x Chilling Zoósporos					
			V8A 10%			V8A 5%	Lavar 3x		Lavar 1x Chilling Zoósporos				
				V8A 10%			V8A 5%	Lavar 3x		Lavar 1x Chilling Zoósporos			
					V8A 10%			V8A 5%	Lavar 3x		Lavar 1x Chilling Zoósporos		
						V8A 10%			V8A 5%	Lavar 3x		Lavar 1x Chilling Zoósporos	
							V8A 10%			V8A 5%	Lavar 3x		Lavar 1x Chilling Zoósporos

 = 0 dias fim-de-semana

 = 1 dia fim-de-semana

 = 2 dias fim-de-semana

 = mais de 2 dias fim-de-semana

ANEXO V

Anexo V:

Tabela 0-1: Índice de NMP.

NMP e limites de confiança, a 95 por cento, para várias combinações de tubos positivos em séries de diluição de 5 tubos usando quantidades de inoculum de 0,1, 0,01, e 0,001 g (mL). [Adaptado de Blodgett (2001)] [Adaptado de Blodgett (2001)]

Tubos Positivos			NMP.g ⁻¹ ou NMP. mL ⁻¹	Limites de Confiança		Tubos Positivos			NMP.g ⁻¹ ou NMP. mL ⁻¹	Limites de Confiança	
0,1	0,01	0,001		Mínimo	Máximo	01	0,01	0,001		Mínimo	Máximo
0	0	0	<1,8	--	6,8	4	0	2	21	6,8	40
0	0	1	1,8	0,09	6,8	4	0	3	25	9,8	70
0	1	0	1,8	0,09	6,9	4	1	0	17	6	40
0	1	1	3,6	0,7	10	4	1	1	21	6,8	42
0	2	0	3,7	0,7	10	4	1	2	26	9,8	70
0	2	1	5,5	1,8	15	4	1	3	31	10	70
0	3	0	5,6	1,8	15	4	2	0	22	6,8	50
1	0	0	2	0,1	10	4	2	1	26	9,8	70
1	0	1	4	0,7	10	4	2	2	32	10	70
1	0	2	6	1,8	15	4	2	3	38	14	100
1	1	0	4	0,7	12	4	3	0	27	9,9	70
1	1	1	6,1	1,8	15	4	3	1	33	10	70
1	1	2	8,1	3,4	22	4	3	2	39	14	100
1	2	0	6,1	1,8	15	4	4	0	34	14	100
1	2	1	8,2	3,4	22	4	4	1	40	14	100
1	3	0	8,3	3,4	22	4	4	2	47	15	120
1	3	1	10	3,5	22	4	5	0	41	14	100
1	4	0	11	3,5	22	4	5	1	48	15	120
2	0	0	4,5	0,79	15	5	0	0	23	6,8	70
2	0	1	6,8	1,8	15	5	0	1	31	10	70
2	0	2	9,1	3,4	22	5	0	2	43	14	100
2	1	0	6,8	1,8	17	5	0	3	58	22	150
2	1	1	9,2	3,4	22	5	1	0	33	10	100
2	1	2	12	4,1	26	5	1	1	46	14	120
2	2	0	9,3	3,4	22	5	1	2	63	22	150
2	2	1	12	4,1	26	5	1	3	84	34	220
2	2	2	14	5,9	36	5	2	0	49	15	150
2	3	0	12	4,1	26	5	2	1	70	22	170
2	3	1	14	5,9	36	5	2	2	94	34	230
2	4	0	15	5,9	36	5	2	3	120	36	250
3	0	0	7,8	2,1	22	5	2	4	150	58	400
3	0	1	11	3,5	23	5	3	0	79	22	220
3	0	2	13	5,6	35	5	3	1	110	34	250
3	1	0	11	3,5	26	5	3	2	140	52	400
3	1	1	14	5,6	36	5	3	3	180	70	400
3	1	2	17	6	36	5	3	4	210	70	400
3	2	0	14	5,7	36	5	4	0	130	36	400
3	2	1	17	6,8	40	5	4	1	170	58	400
3	2	2	20	6,8	40	5	4	2	220	70	440
3	3	0	17	6,8	40	5	4	3	280	100	710
3	3	1	21	6,8	40	5	4	4	350	100	710
3	3	2	24	9,8	70	5	4	5	430	150	1100
3	4	0	21	6,8	40	5	5	0	240	70	710
3	4	1	24	9,8	70	5	5	1	350	100	1100
3	5	0	25	9,8	70	5	5	2	540	150	1700
4	0	0	13	4,1	35	5	5	3	920	220	2600
4	0	1	17	5,9	36	5	5	4	1600	400	4600
						5	5	5	>1600	700	--